

Министерство образования Республики Беларусь
УО «Полесский государственный университет»

ГЛИНСКАЯ Н.А., ВОДЧИЦ Н.В., ВОЛКОВА Е. М., КАСПИРОВИЧ Д.А.

МЕТОДЫ РАБОТЫ С ДНК

Методическое пособие

Пинск
ПолесГУ
2017

УДК 577.21
ББК 28.04

Рецензенты:

кандидат биологических наук, доцент Н.А. Чигрин;
кандидат биологических наук Безрученок, Н.Н.

Утверждено

научно-методическим советом ПолесГУ

Глинская, Н.А.

Методы работы с ДНК / Методическое пособие / Н.А. Глинская, Н.В. Водчиц, Е.М. Волкова, Д.А. Каспирович. – Пинск: ПолесГУ, 2017. – 88с.

В методическом пособии изложены указания по проведению лабораторных занятий по курсу «Методы работы с ДНК». Адресуется студентам биотехнологического факультета, обучающимся по специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям).

ПРЕДИСЛОВИЕ

Курс «Методы работы с ДНК» связан со многими биологическими дисциплинами – физиологией, биохимией, микробиологией, молекулярной биологией, биотехнологией и др.

Особенностью данного курса является формирование у студентов фундаментальных знаний о молекулярно-генетических механизмах, лежащих в основе наследования и формирования полезных признаков у различных организмов; о молекулярной паспортизации сортов; о создании новых информативных тест-систем, позволяющих анализировать генетический полиморфизм на уровне генетического материала клетки (полиморфизм ДНК).

Представленное методическое пособие по дисциплине «Методы работы с ДНК» рекомендуется для использования при проведении лабораторных занятий студентам четвертого курса дневной формы получения образования по специальности 1-31 01 01 Биология (по направлениям) и освоении следующих тем:

1. Структура и организация генома.
2. Основы ПЦР лаборатории.
3. Методы выделения ядерной ДНК.
4. Определение концентрации ДНК и степени ее очистки.
5. Постановка полимеразной цепной реакции.
6. Детекция результатов ПЦР.
7. Визуализация нуклеиновых кислот в УФ-свете.
8. Элюция фрагментов ДНК из гелей агарозы.
9. Постановка ПДРФ анализа и проведение CAPS-маркирования.

ТЕМА 1. ВВЕДЕНИЕ

Занятие 1. Структура и организация генома

Роль ДНК в наследственности

После того как было установлено, что гены находятся в хромосомах и расположены там в определенном порядке, возник вопрос об их химической природе. Ученым было известно, что в состав хромосом высших организмов входят ДНК и несколько типов гистоновых и негистоновых белков. До 40-х годов нашего столетия большинство ученых считали, что гены имеют белковую природу. Русский ученый Н. К. Кольцов высказал мысль, что хромосома это гигантская биологическая молекула, обладающая свойством самоудвоения, и что все свойства и признаки организма обусловлены строением белка и взаимодействием его молекул. Казалось вероятным, что именно в белках заключена наследственная информация о развитии всех признаков и свойств организма. Однако, проведенные в последующем эксперименты на микроорганизмах с применением новейших методов исследований позволили установить, что генетическая информация сосредоточена в нуклеиновых кислотах.

Раскрытию ведущей роли ДНК в наследственности предшествовали экспериментальные работы Ф. Гриффитса (1928), проведенные им по изучению явления трансформации у микроорганизмов. Свои эксперименты он проводил на пневмококках. У этого вида микробов есть два штамма - капсульный (S) и бескапсульный (R). Штамм S вызывает гибель мышей от пневмонии. Он имеет полисахаридную слизистую капсулу и образует гладкие колонии. Штамм R - авирулентный, капсулы не имеет и образует шероховатые колонии. Гриффитс заражал мышей смесью живых бескапсульных бактерий R-штамма и убитых нагреванием капсульных пневмококков S-штамма. В итоге мыши заболевали пневмонией и

погибали, а выделенные из их тканей клетки были как S-, так и R-штаммов. Следовательно, произошло превращение (трансформация) бескапсульных бактерий в вирулентные капсульные бактерии S-штамма.

В 1944 году американский микробиолог О. Эвери с сотрудниками повторил эксперимент Гриффитса. Из бактерий штамма S он выделил ДНК и внес ее в питательную среду, на которой размножались бактерии авирулентного штамма R. Значительная часть авирулентных бескапсульных бактерий штамма R трансформировалась в капсульные вирулентные бактерии S -штамма. Это явление дало Эвери основание утверждать о ведущей роли ДНК в переносе наследственной информации от одного штамма бактерий к другому.

Другой эксперимент, подтверждающий роль ДНК в наследственности, провели американские ученые И. Чейз и Херши. Они размножали ДНК-содержащий вирус-бактериофаг на среде, содержащей радиоактивные фосфор P35 и серу S33. Радиоактивная сера включилась в серусодержащие белки оболочки фага, а радиоактивный фосфор – в ДНК. Далее мечеными радиоактивными изотопами фагами заражали бактерии. С помощью электронного микроскопа было установлено, что радиоактивная сера не проникала в клетку бактерии, внутри клетки был обнаружен только радиоактивный фосфор.

Это свидетельствовало о том, что при заражении бактерии фагом внутрь клетки проникает только ДНК. В зараженной клетке образовалось множество вирионов фага. Следовательно, генетическая информация, необходимая для синтеза ДНК фагов, содержится в ДНК проникших в клетку вирусов. Доказательством ведущей роли ДНК в наследственности является и то, что она локализована главным образом в хромосомах, поэтому молекулярная генетика не противоречит хромосомной теории наследственности и законам классической генетики.

Структура ДНК

Генетическая информация в молекуле ДНК записана в виде последовательности нуклеотидных остатков, которые содержат одно из четырех азотистых оснований: аденин (А), гуанин (G), цитозин (С) и тимин (Т).

Модель ДНК в форме регулярной двойной спирали была предложена Дж. Д. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 году (рисунок 1).

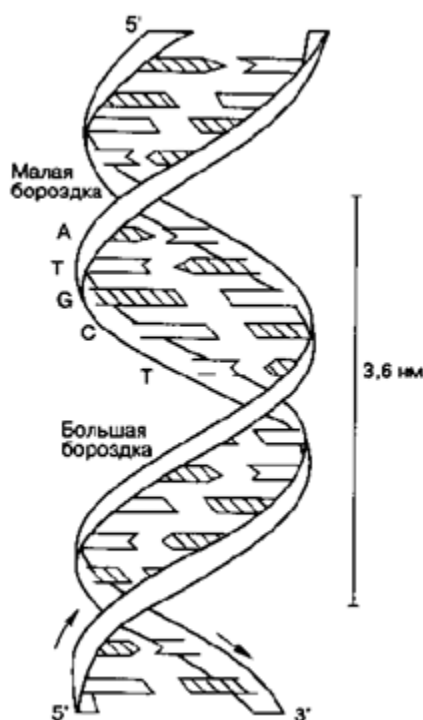


Рисунок 1. – Модель структуры ДНК по Уотсону и Крику

Две спиральные полинуклеотидные цепи закручены вправо вокруг общей оси. Пуриновые остатки заштрихованы. Против каждого из них находится остаток пиримидинового основания другой цепи. На схеме показаны размеры спирали, наличие большой и малой бороздок и антипараллельность двух цепей ДНК. Вначале предполагали, что на виток спирали приходится 10 пар нуклеотидов или 3,4 нм. Последующие измерения показали, что виток соответствует 10,5 пар нуклеотидов, или 3,6 нм.

Каждая цепь содержит последовательность нуклеотидов, строго соответствующую последовательности другой цепи. Это соответствие достигается наличием водородных связей между направленными навстречу друг другу основаниями двух цепей: G и C или A и T. Таким образом, цепи комплементарны. Поскольку цепи имеют противоположную направленность в расположении 5' и 3' свободных концов в молекуле пентозы, их называют антипараллельными.

Репликация ДНК

Уотсон и Крик уже во второй своей работе 1953 года предположили возможный механизм копирования наследственного материала. Легко представить, что цепи молекулы ДНК расходятся и каждая из них становится матрицей, на которой синтезируется новая комплементарная (рисунок 2).

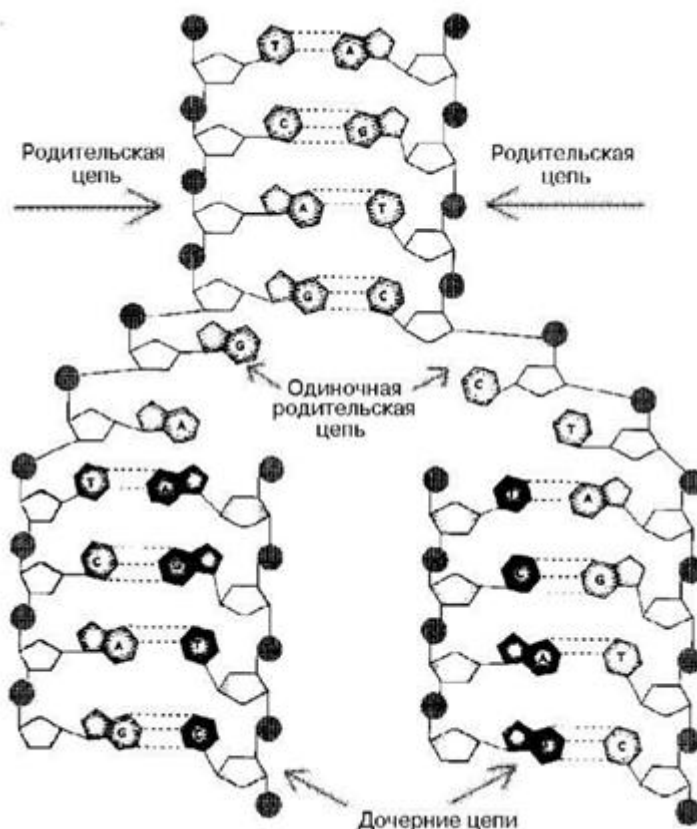


Рисунок 2. – Схема полуконсервативной репликации ДНК

В результате образуются две дочерние двуспиральные молекулы ДНК, неотличимые от родительской молекулы.

Каждая молекула ДНК состоит из одной цепи исходной родительской молекулы и одной вновь синтезированной цепи. Такой механизм копирования называется полуконсервативным. В то же время обсуждались две другие модели, одна из них «консервативная» другая «дисперсионная» (рисунок 3).

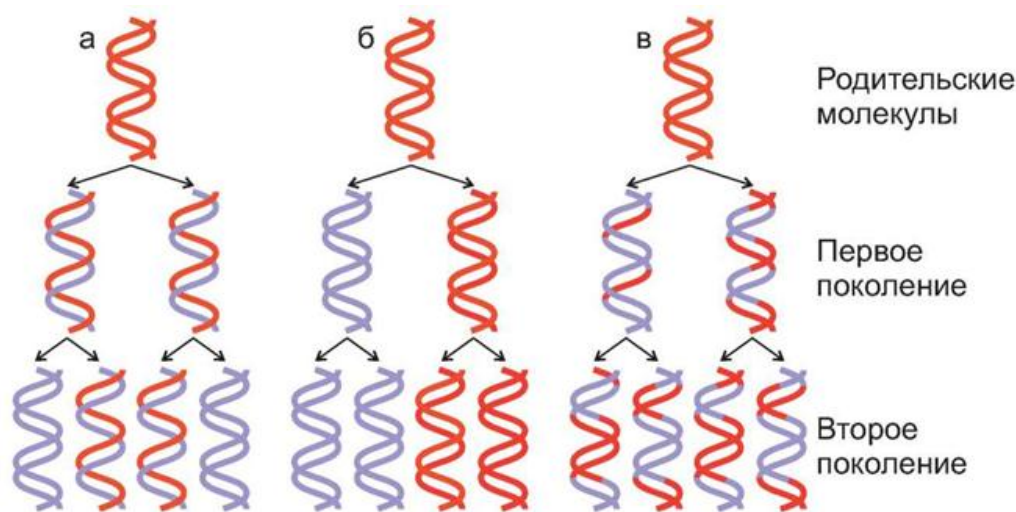


Рисунок 3. – Модели репликации ДНК

(а – полуконсервативная, б – консервативная, в – дисперсионная)

Родительские цепи изображены в виде красных лент, вновь синтезированные показаны синим цветом

Доказали существование полуконсервативной модели М. Мезелсон и Ф. Стайл в 1958 году. Авторы выращивали бактерии *E. coli* несколько поколений на минимальной среде, в которой единственным источником азота был $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (хлорид аммония). В этом соединении нормальный изотоп ^{14}N , был заменен на ^{15}N . В результате все клеточные компоненты бактерий, включая пурины и пиримидины в молекулах ДНК содержали более тяжелый азот ^{15}N . Затем клетки переносили на среду, содержащую изотоп ^{14}N . Через 1 или 2 поколения выделяли ДНК и центрифугировали в градиенте CsCl . Фрак-

ции, содержащие легкие или тяжелые цепи, а так же гибридные $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, легко отделялись одна от другой (рисунок 4).

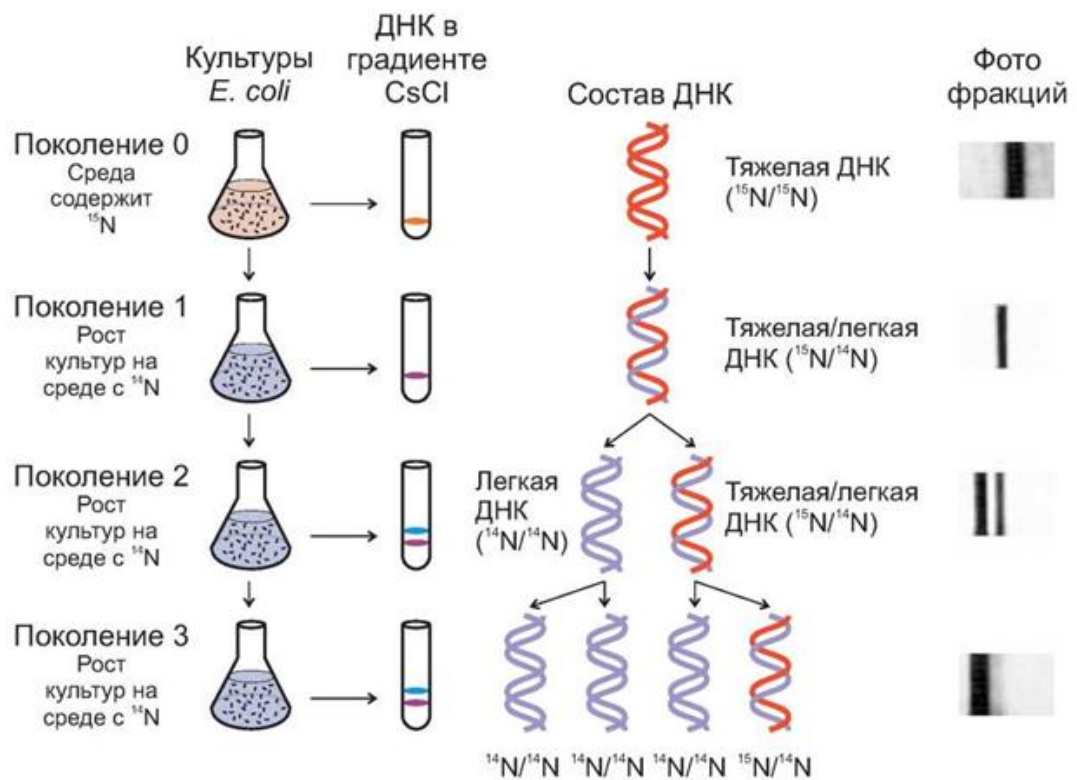


Рисунок 4. – Схема опытов Мезелсона и Сталя, доказывающих полуконсервативную модель репликации ДНК

В 1957 году Артур Корнберг обнаружил у бактерии *E. coli* фермент, катализирующий процесс полимеризации ДНК из нуклеотидов – ДНК-полимеразу. Открытие Корнберга показало, что в основе удвоения молекул ДНК лежат обычные биохимические реакции. По современным представлениям в репликации ДНК у прокариот выделяют следующие этапы:

1. Релаксация суперспирализованной ДНК.
2. Денатурация двойной спирали ДНК.

Поскольку синтез ДНК происходит на одноцепочечной матрице, ему должно предшествовать обязательное разделение двух цепей ДНК. Участок начала расхождения цепей называется репликационной вилкой из-за характерной Y-образной формы (рисунок 5).

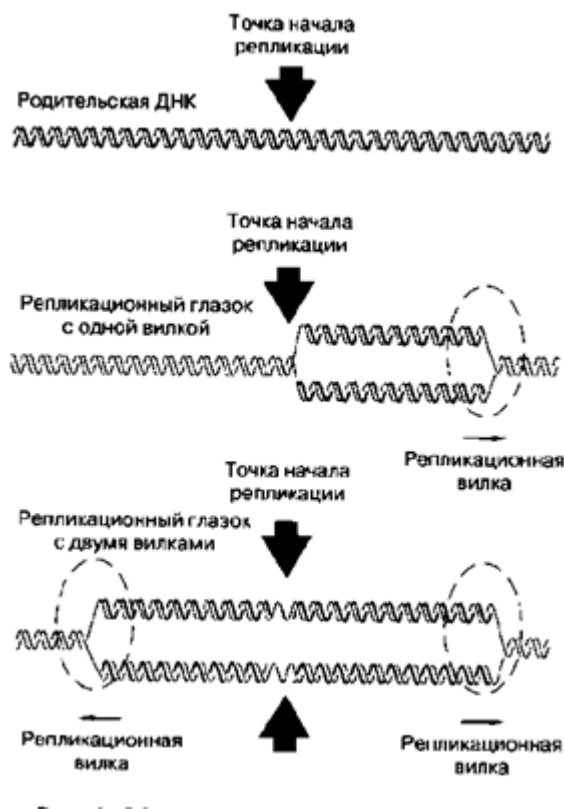


Рисунок 5. – Образование «репликационного глазка» с одной или двумя репликационными вилками.

Именно в этой репликационной вилке ДНК-полимеразы синтезируют дочерние молекулы ДНК. Участок ДНК, в котором репликация уже завершилась, выглядит как пузырек или «глазок» в нереплицированной ДНК. Репликационные глазки образуются в тех местах, где находятся специфические последовательности – точки начала репликации (*origin of replication*). Они состоят примерно из 300 нуклеотидов. С местом начала движения репликативной вилки связываются инициаторные белки репликации.

Для того, чтобы цепи ДНК разъединились, функционирует ДНК-хеликаза; этому процессу помогают ДНК-топоизомераза и множество молекул дестабилизирующего белка (SSB), связывающихся с обеими одиночными цепями. ДНК-хеликаза движется по одиночной цепи ДНК и, встречая

участок двойной спирали, разрывает водородные связи между основаниями, разделяет цепи и продвигает репликационную вилку.

Субстратом для ДНК-полимеразы являются дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (дНТФ), полимеризующиеся на одноцепочечной матрице. ДНК-полимеразы последовательно наращивают одну нить ДНК, шаг за шагом присоединяя к ней следующие звенья в направлении от 5' к 3' концу, причем выбор очередного дНТФ диктуется матрицей. В клетках присутствуют несколько разных типов ДНК-полимераз, выполняющих различные функции и имеющих разное строение, они могут быть построены из различного количества белковых цепей (субъединиц), от одной до десятков. Однако, все они работают на любых последовательностях нуклеотидов матрицы; задача этих ферментов – сделать точную копию каждой матрицы.

Генетический материал живых организмов имеет огромные размеры и реплицируется с высокой точностью. В среднем, в процессе воспроизведения генома млекопитающего, состоящего из ДНК длиной 3 млрд. пар нуклеотидов, возникает не более трех ошибок. При этом ДНК синтезируется чрезвычайно быстро (скорость ее полимеризации колеблется в пределах от 500 нуклеотидов в секунду у бактерий до 50 нуклеотидов в секунду у млекопитающих).

Высокая точность репликации, наряду с ее высокой скоростью, обеспечивается наличием специальных механизмов, осуществляющих коррекцию, т.е. устраняющих ошибки.

Суть механизма коррекции заключается в том, что ДНК-полимеразы дважды проверяют соответствие каждого нуклеотида матрице: один раз перед включением его в состав растущей цепи, второй раз перед тем, как включить следующий нуклеотид. Очередная фосфодиэфирная связь синтезируется лишь в том случае, если последний нуклеотид растущей цепи ДНК образовал правильную комплементарную пару с соответствующим нуклеотидом матрицы.

ДНК-полимеразы не могут начинать синтез ДНК на матрице, а способны только добавлять новые дезоксирибонуклеотидные звенья к 3'-концу уже имеющейся полинуклеотидной цепи. Такую заранее образованную цепь, к которой добавляются нуклеотиды, называют затравкой (или праймером). Короткую РНК-затравку синтезирует из рибонуклеозидтрифосфатов фермент, не обладающий корректирующей активностью и называемый ДНК-праймазой. Праймазная активность может принадлежать либо отдельному ферменту, либо одной из субъединиц ДНК-полимеразы.

Установлено, что дочерние цепи ДНК растут только в направлении 5' —> 3', т.е. всегда удлиняется 3'-конец затравки, а матрица считывается ДНК-полимеразой в направлении 3' —> 5'. Синтез ДНК происходит непрерывно только на одной из матричных цепей. На второй цепи ДНК синтезируется сравнительно короткими фрагментами

- от 100 до 1000 нуклеотидов, названными «фрагментами Оказаки» по имени открывшего их ученого – Тунеко Оказаки (рисунок 6).

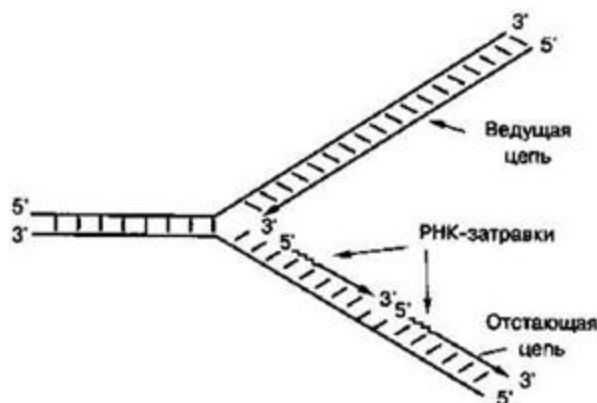


Рисунок 6. – Строение репликационной вилки

В области вилки действуют две ДНК-полимеразы - на ведущей и отстающей цепи. На ведущей цепи ДНК-полимераза работает непрерывно, а на отстающей фермент время от времени прерывает и вновь возобновляет свою ра-

боту, используя короткие РНК-затравки, синтезируемые ДНК-праймазой. Молекула ДНК-праймазы непосредственно связана с ДНК-хеликазой, образуя структуру, называемую праймосомой. Праймосома движется в направлении раскрытия репликационной вилки и по ходу движения синтезирует РНК-затравку для фрагментов Оказаки. В этом же направлении движется ДНК-полимераза ведущей цепи и ДНК-полимераза отстающей цепи. Для этого, как полагают, последняя накладывает цепь ДНК, которая служит ей матрицей, саму на себя, что и обеспечивает разворот ДНК-полимеразы отстающей цепи на 180 градусов. Согласованное движение двух молекул ДНК-полимераз обеспечивает координированную репликацию обеих нитей. Всего в репликационной вилке одновременно работает около двадцати разных белков.

На рисунке 7 показано расположение цепей и молекул ферментов во время репликации.



Рисунок 7. – Расположение основных белков в репликационной вилке

Процесс репликации хромосомы бактерий начинается в точке начала репликации и продолжается до тех пор, пока не удвоится вся ДНК хромосомы.

Молекулярно-биологические процессы, происходящие во время репликации ДНК, похожи у эукариот и прокариот. Если бактериальная хромосома представляет собой единицу репликации – репликон, то репликация ДНК эукариотической хромосомы осуществляется посредством разделения ее на множество отдельных репликонов. Полагают, что у эукариот гомологами ориджинов (точки (сайты) инициации репликации) являются автономно реплицирующиеся последовательности или ARS (*autonomously replicating sequences*). Сначала у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* были выделены особые последовательности, которые, будучи включенными в экстрахромосомальную ДНК, обеспечивали репродукцию этих ДНК в дрожжевой клетке. Позднее такие последовательности были выделены у многих других организмов. По эукариотической хромосоме в каждый момент времени может двигаться независимо друг от друга множество репликационных вилок. Остановка продвижения вилки происходит только при столкновении с другой вилкой, движущейся во встречном направлении, или по достижении конца хромосомы. В результате вся ДНК хромосомы в короткий срок оказывается реплицированной.

Репликоны у эукариот имеют существенно меньшие размеры, чем у прокариот (хотя в пределах генома одного вида они могут варьировать в размерах в 10 раз). Скорость репликации существенно ниже у эукариот.

Генетический код

В любом данном участке ДНК только одна из двух нитей ДНК кодирует аминокислоты, поэтому код – это последовательность нуклеотидов, а не пар нуклеотидов. Генетический код имеет следующие свойства:

1. Генетический код читается группами по три нуклеотида, т.е. код триплетный. Каждый триплет кодирует аминокислоту, каждый триплет называется кодоном.

2. Основные закономерности организации генетического кода были открыты с помощью генетического анализа района II фага Т6. В 1961 г. Ф. Крик и его коллеги показали, что код должен читаться неперекрывающимися триплетами с фиксированной стартовой точки.

а) Неперекрывание подразумевает, что каждый кодон состоит из трех нуклеотидов и каждый последующий кодон представлен следующими тремя нуклеотидами.

б) Фиксированная стартовая точка означает, что считывание начинается на одном конце и завершается на другом; различные части кодирующей последовательности не могут считываться независимо друг от друга. Началом трансляции любого гена является кодон AUG. В конце гена обязательно стоят кодоны UAA, UAG или UGA, которые не кодируют аминокислот и являются сигналами на окончание синтеза белка – стоп-кодоны. Для повышения надежности процесса терминирования стоп-кодоны обычно дублируются. Первым при этом, как правило, выступает кодон UAA (основной терминирующий триплет), а вслед за ним на очень близком расстоянии в той же рамке считывания следует один из запасных терминирующих триплетов – UAG или UGA.

в) Если генетический код считывается неперекрывающимися триплетами, есть только три возможности транслирования нуклеотидной последовательности в аминокислотную, в зависимости от стартовой точки.

ACG ACG ACG ACG ACG ACG CGA CGA CGA CGA
CGA CGA GAC GAC GAC GAC GAC GAC

Эти три возможности называют рамками считывания.

Мутация, в результате которой инсертируется или делегируется один нуклеотид и изменяется рамка считывания всей последующей последовательности, называется сдвигом рамки. Поскольку последовательность новой рамки считывания полностью отлична от первоначальной, вся аминокислотная последовательность будет измененной ниже мутации. Функция такого белка полностью утрачена.

3. Генетический код является вырожденным, в том смысле, что одной аминокислоте может соответствовать несколько кодонов. Однако, кодоны используются не с одинаковой частотой. Например, у дрозофилы, в результате параллельного изучения последовательностей кодонов в генах и аминокислот, кодированных ими, при этом суммарная длина генов соответствовала 269 т.п.н., было показано, что кодоны используются с разными частотами.

4. Генетический код универсален, в том смысле что определённому кодону соответствует определённая аминокислота. Например, AUG-кодон кодирует метионин у любого организма. Однако, по мере расширения круга объектов молекулярной генетики стали накапливаться исключения, сделавшие код «квазиуниверсальным». Касается это прежде всего митохондриальных геномов.

Структура генома эукариот

Главной особенностью генетического материала эукариот в сравнении с прокариотами является наличие избыточной ДНК.

Если средний размер гена бактерий – 1500 п.н., а длина кольцевой молекулы ДНК хромосомы *E. coli* и *Bacillus subtilis* составляет около 1,1 мкм, то в такой хромосоме могут разместиться около 3000 генов. Примерно такое число генов было экспериментально определено у бактерий по числу типов мРНК. Если это число умножить на средний размер гена, то получится, что около 95% генома бактерий состоит из кодирующих (генных) последовательностей.

Иная картина наблюдается у эукариотических организмов. Например, у человека насчитывают приблизительно 5×10^4 генов. В то же время размер генома человека – 3×10^9 п.н. Это означает, что кодирующая часть его генома составляет всего 15-20% от всей ДНК. Существуют виды, геномы которых в десятки раз больше генома человека, например некоторые рыбы, хвостатые амфибии, лилейные растения. Избы-

точная ДНК характерна для всех эукариот. В связи с этим необходимо разграничить понятия геном и генотип. Генотип – это совокупность генов, имеющих фенотипическое проявление. Геном – это количество ДНК в гаплоидном наборе хромосом данного вида.

В конце 60-х годов американские ученые Р. Бриттен и Э. Дэвидсон открыли фундаментальную особенность молекулярной структуры генома эукариот – последовательности нуклеотидов разной степени повторяемости. Это открытие было сделано с помощью молекулярно-биологического метода изучения кинетики ренатурации денатурированной ДНК. Различают следующие фракции в геноме эукариот:

1. Уникальные фрагменты, т.е. представленные в одном экземпляре.

2. Промежуточные (или среднечастотные) повторы. Это последовательности, повторяющиеся десятки и сотни раз.

3. Высокочастотные повторы, число которых в геноме достигает 10^6 копий.

Уникальные последовательности чаще всего представлены генами. Число генов у эукариот определяют одним из двух способов. Первый способ прямой, т.е. экспериментально определяют последовательности нуклеотидов во всем геноме, число последовательностей, содержащих длинные рамки считывания или кДНК-клоны. Понятно, что такой анализ можно провести пока на очень ограниченном числе видов, и эти исследования исключительно интенсивно проводятся в настоящее время (программы «Геном человека», «Геном дрозофилы», «Геном дрожжей» – всего около 30 таких программ). Выполнение подобных программ требует огромных финансовых затрат и скоординированных усилий большого числа ученых из всех развитых стран мира. Например, для того, чтобы расшифровать последовательность нуклеотидов в геноме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* потребовались усилия более чем 600 ученых из 96 лабораторий мира.

Другой подход используют уже 2-3 десятка лет. С помощью довольно простых процедур рассчитывают возможное число генов у того или иного вида. Сначала определяют общий размер генома этого вида, затем, зная средний размер гена у этого вида и добавив к этому значению половину размера собственно гена (межгенный промежуток), делят значение размера генома на значение размера гена + межгенного промежутка и получают число генов. Все эти оценки в какой-то степени субъективны, поэтому варьируют в довольно широких пределах. Варьирование связано с тем, что разные авторы берут в расчет несколько различающиеся значения длин генов, межгенных промежутков, да и общий объем генома.

Повторы образуют семейства – совокупность последовательностей, полностью или по большей части гомологичных друг другу.

Нередко из-за существенных различий в нуклеотидном составе высокочастотных повторов и остальной ДНК первые образуют при центрифугировании в градиенте плотности хлористого цезия так называемые сателлитные пики, которые имеют большую или меньшую плавучую плотность, чем остальная ДНК. Эта фракция генома представлена небольшим (10-15) числом семейств коротких (5-12 п.н.) повторов, образующих протяженные блоки. У огромного большинства видов эта фракция занимает не более 10% генома. Близкие виды, например мышь и крыса имеют совершенно различные высокочастотные последовательности: у крысы их нуклеотидный состав не отличается от основной ДНК, тогда как геном мыши содержит четкий АТ-богатый сателлит. Это означает, что высокочастотные повторы способны к быстрым изменениям в ходе видообразования.

Остальные 90% генома эукариот построены по принципу чередования (интерсперсии) уникальных и повторяющихся последовательностей. Условно выделяют два основных типа интерсперсии, получивших названия по тем видам, у которых они впервые были описаны: интерсперсия типа «ксенопус»

(обнаружена у *Xenopus laevis*) и типа «дрозофила» (впервые описана у *D. melanogaster*). Примерно в 50% генома *Xenopus laevis* уникальные последовательности из 800-1200 п.н. чередуются с повторяющимися, средний размер которых 300 п.н. В остальной части геномов типа «ксенопус» расстояния между соседними повторами значительно превышают 1-2 т.п.н.

Структура генома типа «ксенопус» широко распространена, особенно среди животных. Млекопитающие и человек также относятся к этому типу организации генома. Особенности генома человека и других приматов составляют интерсперсные высокочастотные повторы длиной около 300 п.н. У человека эти повторы содержат сайт, разрезаемый ферментом рестрикции *Alu* I. Число *Alu*-подобных повторов достигает 5×10^5 - 10^6 копий. У дрозофилы параметры интерсперсии резко отличаются от видов с типом генома «ксенопус». Повторяющиеся последовательности длиной 5600 п.н. чередуются с уникальными, длина которых не менее 13000 п.н. Интересно отметить, что у *Musca domestica*, – вида, близкого *D. melanogaster*, геном устроен по типу «ксенопус». Этот факт прямо указывает на то, что в ходе эволюции возможны очень быстрые преобразования характера чередования последовательностей.

Птицы по параметрам интерсперсии занимают промежуточное положение между типом «ксенопус» и типом «дрозофилы». Многие виды не могут быть отнесены ни к одному типу.

Мобильные элементы генома

Мобильные элементы геномов растений

В начале 1940-х годов американская исследовательница Барбара МакКлинток открыла существование гена или локуса, который вызывал повышенные частоты хромосомных перестроек у кукурузы. Среди потомков от скрещивания, в котором оба родителя несли такие перестройки, появлялись нестабильные мутации с неожиданно высокой частотой. В 1948

году она опубликовала результаты исследований этого локуса, вызывающего разрывы хромосом, сделав вывод, что он был совершенно необычным поскольку мог перемещаться из одного участка хромосомы в другой. Б. МакКлинтон назвала феномен перемещения транспозицией, а сами локусы – «контролирующими элементами» (КЭ). Эти элементы характеризуются следующими свойствами:

1. Они могут перемещаться из одного сайта в другой.
2. Их встраивание в данный район влияет на активность генов, расположенных рядом.
3. Утрата КЭ в данном локусе превращает прежде мутабельный локус в стабильный.
4. В сайтах, в которых присутствуют КЭ, могут возникать делеции, транслокации, транспозиции, инверсии, а также разрывы хромосом.

Геном кукурузы содержит несколько семейств КЭ. Члены каждого семейства могут быть подразделены на два класса:

1) Автономные элементы, которые способны вырезаться и транспозироваться. Их внедрение ведет к появлению нестабильных аллелей. Неавтономные элементы теряют свою стабильность только в том случае, если в какой-то области генома присутствует автономный член того же семейства.

2) Неавтономные элементы могут быть активированы только определенными автономными элементами (членами того же семейства). У кукурузы изучены лучше всего *Ac-Ds*, *Spm* (супрессор-мутатор) и *Dt* семейства.

При встраивании автономного элемента в ген, последний мутирует, однако мутация эта будет нестабильной, поскольку элемент может выйти из данного гена и переместиться в другой участок генома. Поскольку частота транспозиции значительно выше, чем частота обратного спонтанного мутирования, то аллель, индуцированный автономным элементом, называется мутабельным.

Система *Ac-Ds* у кукурузы была изучена в деталях. *Ac*-элемент имеет длину 4563 п.н. с инвертированными повторами (IR) на концах. Он содержит единственную единицу транскрипции (5 экзонов и 6 интронов), кодирующего фермент транспозазу. Элементы *Ds* происходят из *Ac* в результате делеций внутренних участков *Ac*-элемента (рисунок 8).

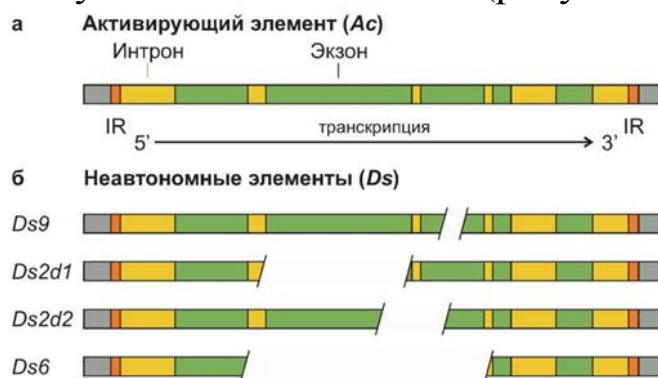


Рисунок 8. – Структура автономного *Ac*-элемента (а) и неавтономных *Ds*-элементов (б) у кукурузы

Если растение имеет аллель гена *C* дикого типа, зерно будет иметь пурпурную окраску (рисунок 9а.), если *Ac* элемент индуцировал инсерцию *Ds* в ген *C*, возникает мутантный аллель *c*, и окраска зерна будет бесцветной (рисунок 9б.). В ходе развития *Ds* элемент может в некоторых клетках выйти из гена *C*, в результате чего зерна вновь приобретут пурпурную окраску. Таким образом, возникает мозаичность (рисунок 9в.).

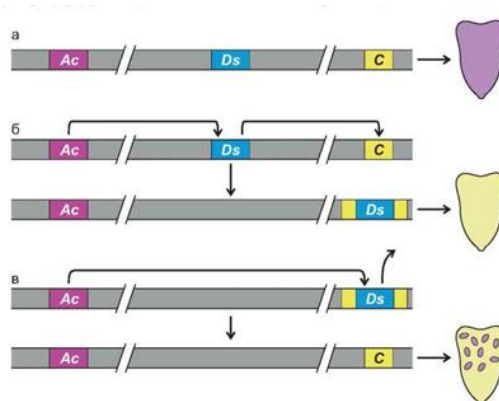


Рисунок 9. – Изменение окраски кукурузного зерна под влиянием перемещений элементов *Ac-Ds*

К настоящему времени мобильные элементы открыты у множества видов растений, животных и микроорганизмов. Ниже дается их классификация и подробное описание.

По механизмам транспозиции мобильные элементы делятся на две большие группы: элементы класса I перемещаются, используя обратную транскриптазу, т.е. на ДНК-матрице мобильного элемента синтезируется РНК. Фермент, осуществляющий эту реакцию синтеза ДНК на РНК, называют обратной транскриптазой или (в русской литературе) - ревертазой. Обратная транскриптаза не только ведет синтез нити ДНК на РНК, но и осуществляет синтез второй комплементарной нити ДНК, а РНК-матрица распадается и удаляется. Двунитевая ДНК синтезируется в цитоплазме, а затем перемещается в ядро и может встроиться в геном, образуя провирус. Такие мобильные элементы называют ретротранспозонами (или ретропозонами). Элементы класса II перемещаются непосредственно как ДНК-овые элементы. Такие элементы называются транспозонами.

Ретровирусоподобные элементы или ретротранспозоны обладают способностью ретровирусов встраивать (в форме провирусов) ДНК-копии своих РНК-геномов в хромосомы клеток-хозяев. Ретропозоны имеют прямые повторы (LTR) на каждом конце. Есть потенциальный тРНК праймер-связывающийся сайт (PBS), сразу после левого LTR, и обогащенная пуринами последовательность непосредственно перед правым LTR. ДНК между LTR-ами содержит открытые рамки считывания. Первая из них имеет гомологию с геном *gag* ретровирусов, который кодирует белковые компоненты нуклеопротеиновой сердцевины вириона. Вторая рамка напоминает вирусный ген *pol* и кодирует потенциальную обратную транскриптазу (RT). У некоторых мобильных элементов эти открытые рамки сливаются. Некоторые элементы имеют три рамки. Третья рамка находится в похожем положении с вирусными генами *env*, но имеет другую последовательность нуклеотидов. У ретровирусов ген *env* кодирует

компоненты оболочки вирусной частицы. Элементы этого типа встречаются у дрозофилы (*coria-like*), у дрожжей (*Ty*), у грызунов (*IAP* и *VL30*), у человека (*THE*), у кукурузы (*BS1*).

Элементы, не имеющие концевых повторов (не вирусные ретропозоны) обычно имеют две открытые рамки считывания. Первая напоминает ген *gag*, а вторая кодирует потенциальную обратную транскриптазу (RT). У этих элементов есть последовательность, обогащенная аденином (*An*) на 3' конце одной из нитей (ее нет у *R1Bm*-элемента, встраивающегося в некоторые гены 28 S РНК у *Bombix mori*). У них часто делегирован определенный участок с 5' конца, но они имеют фиксированный 3' конец. Транспозоны такого типа встречаются у млекопитающих (*L1*), у дрозофилы (*I*, *F*, *G*, *jockey*), у трипаносомы (*INGI/TRS1*), у кукурузы (*Cin4*), а также инсерции в 28 S рРНК у *Bombix mori*, *D. melanogaster*, *Ascaris lumbricoides*.

Второй класс элементов объединяет представителей которые перемещаются в геноме, как ДНК-элементы. В этот класс входят транспозоны бактерий (*IS*-элементы), *P* и *hobo* у дрозофилы, *Ac/Ds* и *Spm/En* у кукурузы, *Tam* у *Antirrhinum majus* и *Tc1* у нематоды *C. elegans*. Все они имеют короткие инвертированные повторы на концах. *P*, *Ac* и *Spm/E* кодируют по крайней мере одну функцию транспозазы, поскольку элементы с внутренними делециями могут перемещаться только в присутствии полных элементов.

Элементы с длинными концевыми инвертированными повторами составляют вторую группу класса II. Это *fold-back* (или *FB*) элементы у дрозофилы, *TU* у морского ежа. О механизмах их перемещений известно мало.

Мобильные элементы у дрозофилы

Скращивания определенных линий дрозофилы приводит к образованию потомства с «дисгенетическими признаками». Это выражается в появлении у них серии генетических дефектов, таких как мутации, хромосомные aberrации, нару-

шение расхождения хромосом в мейозе и стерильность. Комплекс этих генетических аномалий характеризует явление, получившее название гибридного дисгенеза.

У дрозофилы были выделены несколько систем, обуславливающих гибридный дисгенез: например, I-R, P-M. При скрещиваниях самцов из линий I (*inducer*) с самками R (*reactive*) наблюдается уменьшение плодовитости потомства, однако реципрокное скрещивание проходит нормально.

Скрещивание между самцом P (*paternal*) и самкой M (*maternal*), вызывает дисгенез, а в реципрокном скрещивании этого эффекта нет.

Дисгенез проявляется преимущественно в зародышевых клетках. Морфологический дефект в развитии зиготы проявляется начиная со стадии, на которой в зародышевой линии начинается быстрое клеточное деление. Дисгенез вызывается фактором P, находящемся в хромосомах P-линии, в линии M нет P-фактора. Показано, что P-фактор активируется под действием M-цитоплазмы, унаследованной по материнской линии. Материнская M-цитоплазма названа M-цитотипом. Внедрения P-элемента стабильны, если хромосома находится в P-цитотипе; если хромосома попадает в M-цитотип, P-элементы начинают перемещаться.

Любая хромосома P-самца может вызвать гибридный дисгенез в скрещиваниях с M-самкой. В пределах же одной хромосомы довольно много районов способно вызвать дисгенез. Это предполагает, что P-самец в своем геноме имеет большое число P-факторов, число которых варьирует от 30 до 50, и в разных линиях сайты их локализации различны.

ДНК P-элемента выделена и охарактеризована. Полный P-элемент имеет длину 2907 п.н., и ограничен терминальными повторами размером 31 п.н. Функционально это один ген, дающий транскрипт размером 2,7 т.п.н., кодирующий белок с молекулярным весом 87kDa – транспозазу. В половых клетках все три интрона процессируются. В соматических клет-

ках третий интрон не процессируется, что определяет специфичность активирования перемещений в половых клетках.

В результате трансляции РНК, синтезированной в соматических клетках, формируется белок размером 66 кДа, который является репрессором активности транспозона.

В половых клетках удаляются все три интрона, в результате чего четыре экзона входят в состав мРНК, которая в результате трансляции дает белок размером 87 кДа, являющийся катализатором транспозиции – транспозазой.

Для осуществления транспозиции Р-элемента необходимы примерно 150 п.н. на терминальных концах элемента. Транспозаза связывается с последовательностью длиной 10 п.н., расположенной рядом с инвертированным повтором 31 п.н. Транспозиция происходит по принципу «вырезание – встраивание».

Эффект цитотипа при гибридном дисгенезе у дрозофилы объясняется моделью, представленной на рисунке 10.

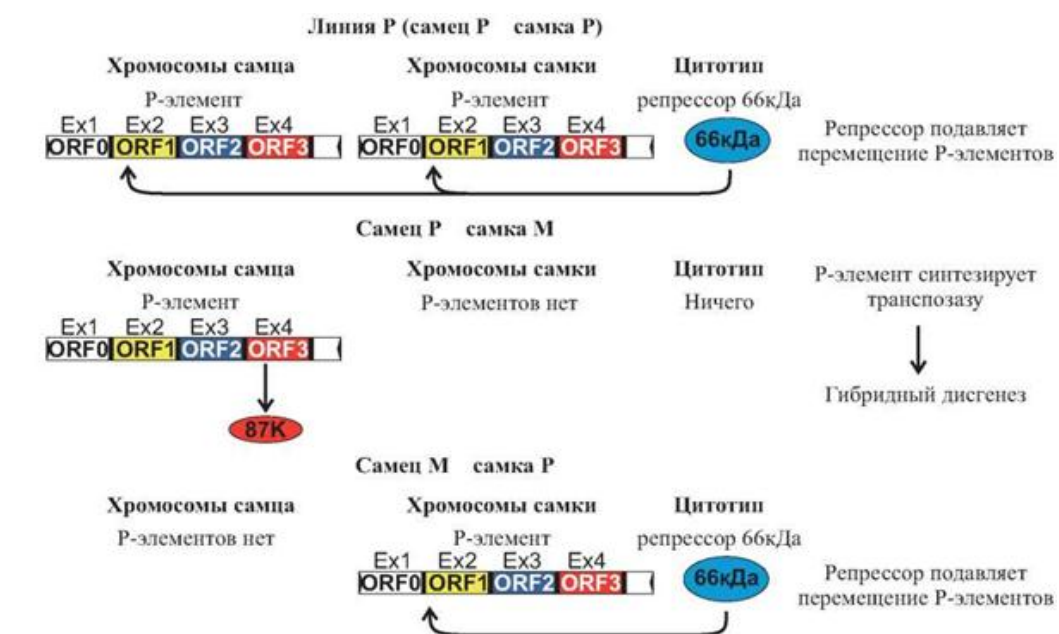


Рисунок 10. – Модель гибридного дисгенеза, основанная на взаимодействиях между Р-элементом в геноме и репрессорным белком 66 кДа в цитотипе

Белок 66 кДа, который репрессирует транспозицию, в большом количестве представлен в яйце как материнский фактор. В линии Р должно быть достаточно этого белка, чтобы полностью предотвратить транспозицию, хотя Р-элементы и присутствуют. В любом скрещивании, в котором принимает участие Р-самка, транспозаза не синтезируется. В том случае, когда самка М-цитотипа, в яйце не накапливается белок репрессор, и внесение Р-элемента из генома самца приводит к наработке транспозазы в клетках зародышевого пути.

Интересно, что линии *D. melanogaster*, выделенные из диких популяций более 30 лет назад, всегда имеют М-цитотип. В последние 10 лет почти все дикие популяции имеют Р-элементы. Полагают, что повсеместное распространение Р-элемента связано с инвазией и что источником его являются какие-то другие виды.

Кроме Р-элемента у дрозофилы известно множество других мобильных элементов. Впервые они были выделены и охарактеризованы в лабораториях Г.П. Георгиева и В.А. Гвоздева в России, а также Д. Хогнеса в США в 1975-1976 гг. Около 12% генома дрозофилы приходится на умеренные повторы, примерно четверть от этого количества занято умеренно повторенными генами (рРНК, гистоны). Остающиеся 15000 т.п.н. (9% генома) организованы примерно в 50 семейств мобильных элементов. Мобильные элементы часто получают названия, отражающие их способность к перемещению: Магеллан, «Бигль», *hobo* – бродяга, *gypsy* – цыган, *flea* – блоха, *burdock* – репейник, *jockey* – наездник и т.д. Они отличаются друг от друга по следующим характеристикам:

1. По размерам – средние размеры – 5 т.п.н., причем самый маленький – «элемент 1360» – 1,176 т.п.н., самый большой – «17,6» – имеет размер 7,4 т.п.н.

2. По числу копий: от 1 до 120 копий на геном.

3. По наличию и размерам длинных концевых повторов (ДКП-LTR). Они могут иметь длину 270-840 п.н., быть прямыми или обратными.

4. По индукции дупликаций в сайте встраивания – 4-6 п.н.

Ту-элементы у дрожжей

На рисунке 11 показана схема организации транспозона *Tu*. Он ограничен на концах длинными концевыми повторами (LTR) или дельта (δ). Элементы дельта на 70% состоят из АТ последовательностей. Каждый из них имеет промотор и последовательность, опознаваемую ферментами транспозиции. *Tu*-элемент имеет длину 5,9 т.п.н. и кодирует единственную мРНК длиной 5700 н, старт транскрипции которой находится в промоторе элемента дельты. Матричная РНК имеет открытые рамки считывания, т.е. рамку, начинающуюся со стартового кодона и кончающуюся терминирующим кодоном. Эти две рамки называют *TuA*, *TuB*.

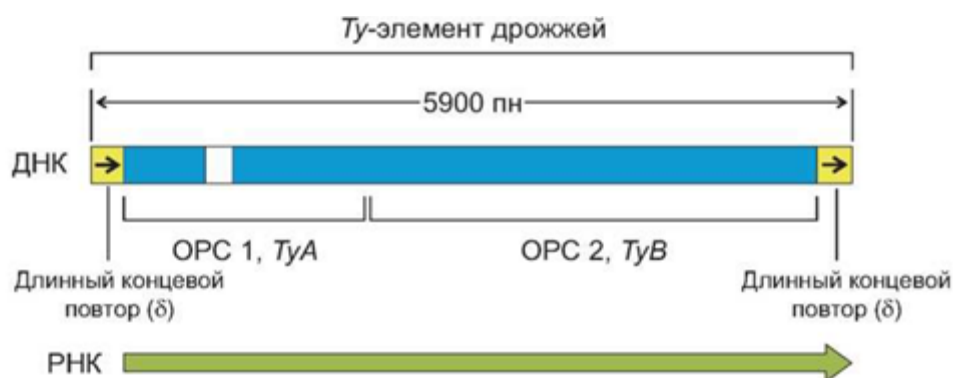


Рисунок 11. – Схема организации *Tu*-элемента у дрожжей. ОРС1 и ОРС2 - открытые рамки считывания, светлый промежуток в ОРС1 – энхансерный элемент

Генетических маркеров у этого транспозона нет, поэтому следить за его перемещениями трудно.

Tu – имеет много черт сходства с ретровирусами: в частности, транспозиции у них происходят как у ретротранспозонов, уже установлено, что *Tu*-элемент кодирует обратную транскриптазу.

Транспозоны млекопитающих

У млекопитающих в составе генома обнаружено несколько классов умеренно повторенных последовательностей: SINE (*short interspersed nuclear sequences*) и LINE (*long interspersed nuclear sequences*). Элементы SINE – это фрагменты длиной 100-300 п.н., чередующиеся с уникальными последовательностями от 1000 до 2000 п.н. длиной. Элементы LINE имеют длину более 5 т.п.н., они чередуются с уникальными последовательностями до 35 т.п.н. длиной. Как SINE, так и LINE представлены семействами, состоящими из одинаковых элементов.

В геноме человека SINE широко представлено семейством элементов *Alu*. Члены этого семейства имеют длину 300 п.н. и повторены от 300000 до 500000 раз в геноме. Около 3% генома человека приходится на долю этих повторов. Наименование *Alu* этот элемент получил поскольку содержит сайт рестрикции рестриктазы *AluI*. Каждая *Alu*-последовательность фланкирована прямыми повторами длиной от 7 до 20 п.н. По этой причине полагают, что *Alu*-повторы являются мобильными элементами, скорее всего ретротранспозонами.

Одно из семейств, принадлежащих LINE, это LINE-1 (или L1-элемент). Полагают, что в геноме человека присутствует от 50 до 100 тыс. копий L1-элемента, т.е. он представляет около 5% генома. Максимальная длина этих элементов составляет 6500 п.н., хотя таких элементов в геноме не более 3500. Остальные же копии по аналогии с *Ds* элементами кукурузы имеют внутренние делеции различной длины. Полно-размерные L1 элементы содержат большие открытые рамки считывания, имеющие гомологию с известными обратными транскриптазами.

Функциональное значение мобильных элементов

Наличие мобильных элементов в геномах имеет разнообразные генетические последствия.

1. Перемещения и внедрение мобильных элементов в гены может вызывать мутации. Около 80% спонтанных мутаций, изученных в разных локусах дрозофилы, вызвано инсерциями мобильных элементов. Внедряясь в ген, мобильный элемент может повредить экзон, разорвав его. В таком случае ген будет лишен возможности кодировать белок. Попадая в район промоторов или энхансеров, мобильный элемент может повредить регуляторную зону гена. Наконец, инсерция в район интрона может оказаться безвредной, поскольку вся последовательность интрона вместе с мобильным элементом будет вырезана во время процессинга мРНК, а соседние экзоны беспрепятственно сплайсируются.

2. Изменение состояния активности генов.

Длинные концевые повторы (ДКП) мобильного элемента являются промоторами ретротранспозона, причем как ДКП, так и сам ретротранспозон содержит нуклеотидные последовательности, являющиеся энхансерами транскрипции. Поэтому перемещение этих сигналов в геноме может изменять регуляцию активности генов. Например, если мобильный элемент оказался около протоонкогена, то результатом может быть сверхпродукция белка и злокачественное перерождение клетки.

В случае ретротранспозонов особые возможности для перенесения и приобращения регуляторных сигналов возникают в том случае, когда элемент удаляется за счет кроссинговера между ДКП с идентичными последовательностями (рисунок 12а), в результате сохраняется лишь один ДКП на месте внедрения ретротранспозона. Это явление широко распространено в клетках дрожжей. Установлено, что такие одинокие ДКП оказывают серьезное влияние на изменчивость регуляторных систем дрожжевой клетки.

3. Формирование хромосомных перестроек.

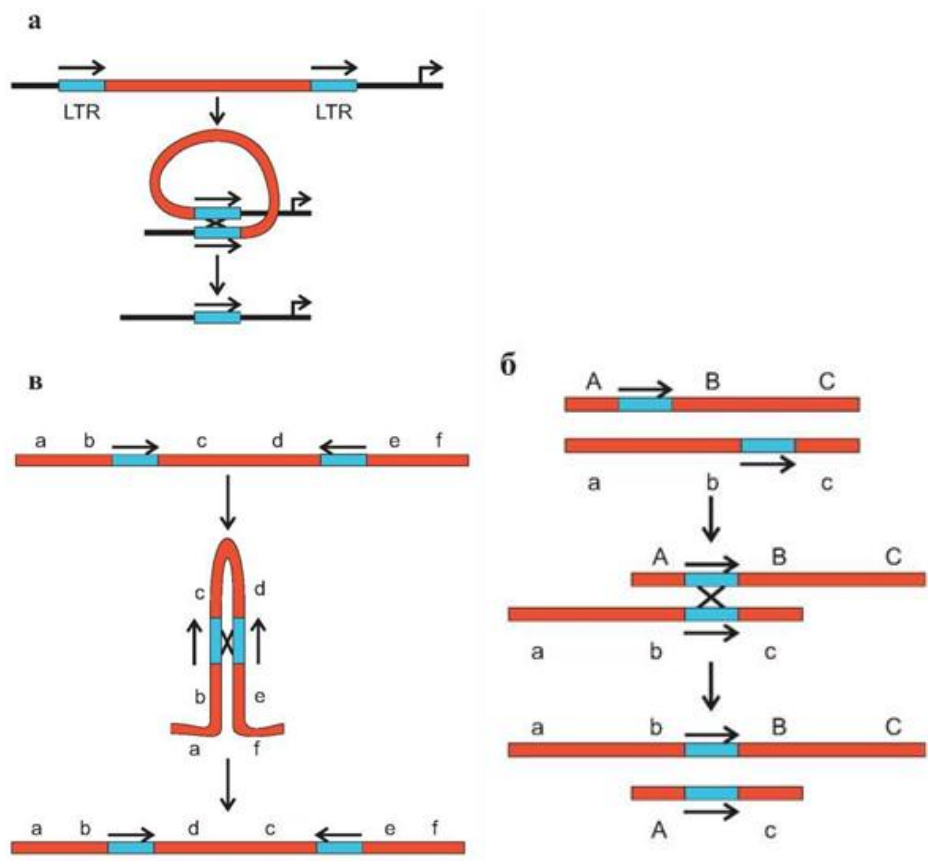


Рисунок 12. – Возникновение подвижного промотора из-за кроссинговера между ДКП (а), делеции и дупликации из-за кроссинговера между мобильными элементами ориентированными в одну сторону (б) или инверсии из-за кроссинговера между противоположно ориентированными элементами (в)

В результате кроссинговера между одинаково ориентированными элементами возникает делеция и дупликация материала, расположенного между инсерциями (рисунок 12б). Если инсерции ориентированы в противоположном направлении, возникает инверсия (рисунок 12в).

4. У дрозофилы отсутствует теломеразная машина, но концы ДНК удлиняются за счет перемещений ретротранспозонов.

5. Участие в горизонтальном переносе генов.

Инфекционные ретровирусы способны заражать организмы, принадлежащие к разным видам и переносить соб-

ственный генетический материал, образуя копии ДНК, встраивающиеся в геном. Таким образом могли распространяться ретротранспозоны. Подобный способ передачи генов получил название горизонтального в отличие от вертикального наследования генов из поколения в поколение. Широкое распространение транспозона *mariner* среди филогенетически отдаленных групп организмов может свидетельствовать о повторных переходах данного элемента от вида к виду. Так, один из ретротранспозонов дрозофилы (*gypsy*), как оказалось, является настоящим ретровирусом: путем инъекции или скармливанием вирусных частиц удастся заразить мух, не несущих этих ретротранспозонов.

6. Транспозоны на основе Р-элемента используют для трансформации у эукариот, клонирования генов, поиска энхансеров.

Мобильные элементы прокариот

У прокариот существуют три типа мобильных элементов - *IS*-элементы (*insertion sequence*), транспозоны (*Tn*) и некоторые бактериофаги.

IS-элементы

Эти элементы содержат только минимальное число генов, необходимых для мобилизации элемента и его инсерции в новый участок хромосомы. *IS*-элементы являются обычным компонентом бактериальных хромосом и плазмид. Три инсерционных элемента – *IS1*, *IS2*, и *IS10R* представлены в геноме *E. coli* в 0-30 копиях. Их размеры варьируют от 768 до 1329 п.н. Некоторое число копий этих элементов встречается в плазмидах. Они содержат ген транспозазы. На концах *IS*-элементов находятся инвертированные повторы *IR*, длина которых варьирует от 22 до 41 п.н. В участке встраивания *IS*-элементов в геномной ДНК образуется дупликация размером от 5 до 9 п.н.

Поскольку *IS*-элементы встраиваются в любой участок ДНК, они часто вызывают мутации, разрушая кодирующие или регуляторные последовательности.

Промоторы в самом *IS*-элементе могут влиять на экспрессию соседних генов. Из-за присутствия *IS*-элементов в хромосоме кроссинговер между ними может вызывать делеции и инверсии.

В процессе встраивания *IS*-элементов происходит точное копирование уже встроенного элемента, затем старая копия остается на месте, а вновь синтезированная внедряется в новый сайт. Репликация новой копии происходит с использованием энзимов репликационной машины клетки хозяина. Транспозиция происходит с использованием транспозазы, которая опознает *IR* последовательности, где и иницируется транспозиция. Мутации в *IR* фрагментах влияют на частоту транспозиции. Частота транспозиций варьирует между 10^{-5} и 10^{-7} на одно поколение.

Транспозоны

Эти элементы (*Tn*) устроены значительно сложнее. Известны два типа транспозонов эукариот: сложные и не сложные. Сложные (*composite*) транспозоны имеют центральный район, содержащий гены. На обоих концах транспозона расположены *IS*-элементы. Оба *IS*-элемента в пределах одного транспозона принадлежат к одному типу и называются «левый» и «правый».

Транспозоны *E. coli* варьируют по длине от 2638 п.н., до 9300 п.н., имеют гены чувствительности к антибиотикам, *IS*-элементы на концах. В участках встраивания в хромосоме хозяина образуется дупликация длиной 9 п.н. Транспозиции происходят, поскольку один или оба *IS*-элемента представляют транспозазу. Не сложные (*noncomposite*) транспозоны также содержат гены чувствительности к антибиотикам, однако эти транспозоны не терминируются *IS*-элементами. На

своих концах они все-таки имеют повторенные последовательности, необходимые для транспозиций.

IS-элементы и транспозоны в плазмидах

Одной из первых открытых плазмид была плазида F (F-фактор). Эта кольцевая структура имеет длину 94,5 т.п.н. и содержит ряд генов: а) *tra* (transfer) гены, необходимые для переноса ДНК из бактерии-донора в бактерию-реципиента, б) гены, необходимые для репликации плазмиды, в) четыре IS-элемента: две копии *IS3*, одну копию *IS2* и один элемент – $\gamma\delta$ (рисунок 13).

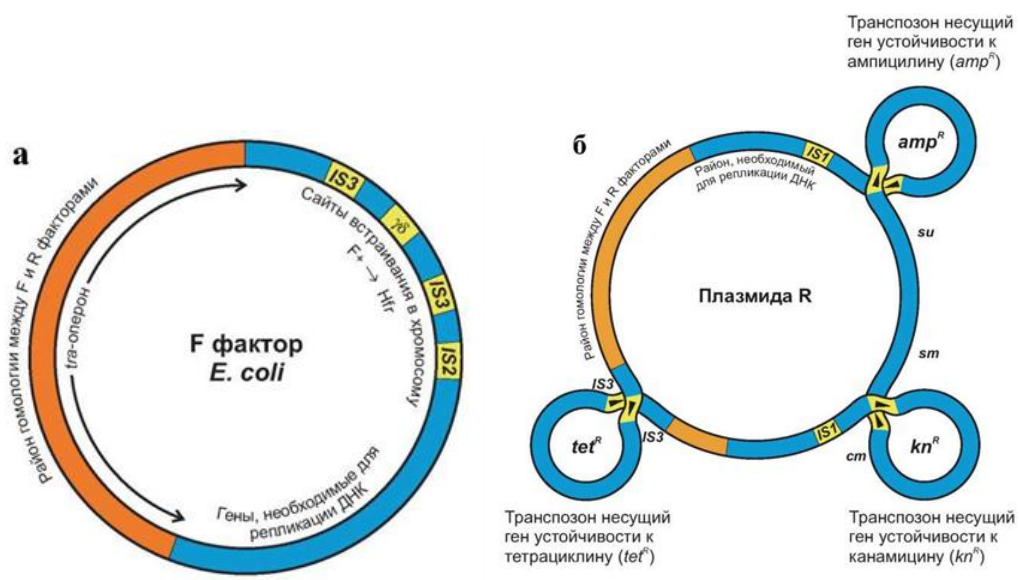


Рисунок 13.– Карты F-фактора *E. coli* (а) и плазмиды R (б).

Поскольку в различных позициях в хромосоме *E. coli* имеются копии этих же инсерционных элементов, F-фактор может встраиваться в различные участки бактериальной хромосомы и в различной ориентации. Встраивание происходит за счет кроссинговера между гомологичными последовательностями инсерционных элементов.

Плазида R имеет те же *tra* гены, что и в F факторе, гены, необходимые для репликации ДНК, затем есть две копии

IS1 элемента, кроме того, есть три гена резистенции к антибиотикам – *amp* (ампициллин), *kan* (канамицин) и *tet* (тетрациклин). Эти гены фланкированы терминальными повторенными последовательностями и, следовательно, сами являются истинными транспозонами. Плазмида R, обычно находящаяся у патогенной бактерии *Shigella*, передается другим (нерезистентным к антибиотикам) штаммам этого вида, а также другим бактериям, населяющим кишечник человека, в результате чего они приобретают резистентность.

Бактериофаг *Mu*

Это умеренный бактериофаг, инфицирующий *E. coli*, «умеренный» – значит может проходить через литический цикл или лизогенную стадию. В то же время, это транспозон и он может вызывать мутации в результате встраивания.

В фаговой частице *Mu* геном содержит 37 т.п.н. линейной молекулы ДНК, главным образом фаговой с небольшими фрагментами ДНК из хромосомы *E. coli* на каждом из концов.

ТЕМА 2. УСТРОЙСТВО ПЦР-ЛАБОРАТОРИИ

Занятие 2. Организация работы ПЦР-диагностической лаборатории. Перечень необходимого оборудования

Благодаря высокой специфичности и чувствительности метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) находит широкое применение в медицине (диагностика инфекций, диагностика иммунных патологий, генетические исследования наследственных заболеваний), ветеринарии, животноводстве и растениеводстве (инфекционные заболевания, определение видовой принадлежности), науке (генная инженерия, микробиология, генетика и др.), промышленности (определение биологического загрязнения), судебной медицине (идентификация личности).

Однако ПЦР-анализ связан с проблемой, обусловленной высокой чувствительностью метода – возможностью контаминации.

Контаминация – попадание из внешней среды в реакционную смесь специфических и неспецифических молекул нуклеиновых кислот, способных служить мишенями в реакции амплификации и давать ложноположительные или ложноотрицательные результаты.

Сотрудник, занимающийся ПЦР-диагностикой, в своей работе сталкивается с тремя видами контаминации:

1. Перекрестная контаминация от пробы к пробе (в процессе обработки биоматериала или при раскапывании реакционной смеси), приводящая к появлению спорадических ложноположительных результатов.

2. Контаминация продуктами амплификации (ампликонами), имеющая наибольшее значение, поскольку в процессе ПЦР ампликоны накапливаются в огромных количествах и являются идеальными продуктами для реамплификации.

3. Контаминация следовыми количествами ампликонов: посуды, автоматических пипеток и лабораторного оборудования, поверхностей лабораторных столов или даже поверхности кожи сотрудников лаборатории приводит к появлению систематических ложноположительных результатов.

Как правило, определить источник контаминации бывает очень трудно и требует значительных затрат времени и средств.

Накопленный к настоящему времени опыт работы лаборатории, использующей полимеразную цепную реакцию для проведения ПЦР-ПДРФ анализа позволяет сформулировать основные требования: 1) к планировке помещений и организации работы ПЦР лаборатории; 2) к выделению основных зон.

Планировка помещений и основные принципы организации работы ПЦР-диагностической лаборатории

1. Лаборатория разделяется на зоны (комнаты) для каждой из стадий ПЦР-диагностики:

- пре-ПЦР-помещение, в котором обрабатываются образцы, выделяется ДНК, приготавливается реакционная смесь для ПЦР для последующей постановки ПЦР (при наличии условий два последних этапа проводятся в дополнительном отдельном помещении); в этих помещениях запрещается проводить все другие виды диагностических работ, ПЦР-диагностика которых проводится в данной лаборатории;

- пост-ПЦР-помещение, в котором проводится детекция продуктов амплификации; в пост-ПЦР-помещении допускается использовать другие методы детекции мутаций, диагностика которых проводится в данной лаборатории.

2. Комната детекции продуктов амплификации (пост-ПЦР-помещение) располагается как можно дальше от пре-ПЦР-помещений.

3. Исключается движение воздушного потока из пост-ПЦР в пре-ПЦР-помещения.

4. В комнате приготовления реакционной смеси и в комнате обработки образцов устанавливаются настольные боксы с ультрафиолетовыми лампами.

5. Работа в лаборатории организовывается в одном направлении: от пре-ПЦР-помещений к пост-ПЦР-помещению.

6. Каждое помещение ПЦР-диагностической лаборатории должно иметь свой набор реагентов, автоматических дозаторов, наконечников, пластиковой и стеклянной посуды, лабораторного оборудования, халатов и перчаток, используемых только в данной зоне и не выносящихся в другие ПЦР-помещения. Оборудование, материалы и инвентарь в каждой комнате должны иметь соответствующую маркировку.

7. Обработка рабочей одежды из пре- и пост-ПЦР-помещений должна производиться раздельно.

8. Перчатки используются однократно, как в комнате обработки биопроб, так и в комнате приготовления реакционной смеси и постановки ПЦР.

10. Используются наконечники для автоматических дозаторов с аэрозольным барьером (или наконечники с ватными фильтрами, приготовленными в помещении, в котором не ведутся работы с ДНК) при работе с образцами, а также при внесении выделенной ДНК в реакционную пробирку.

11. Постоянно поддерживается чистота на рабочем месте:

- каждое помещение должно иметь свой отдельный набор инвентаря для обработки и уборки рабочего места (ватно-марлевые тампоны, пинцет, 70% этанол, дезинфицирующий раствор и т.д.), и источники ультрафиолетового излучения, которые эффективно инактивируют ДНК-матрицы;

- при манипуляциях с биологическим материалом рабочая поверхность до и после исследования обрабатывается дезинфицирующим раствором и затем – 70% этанолом;

- в комнате приготовления реакционной смеси до работы обрабатывается рабочая поверхность 70% этанолом с целью борьбы с пылью.

12. Полностью исключается проведение в ПЦР-диагностической лаборатории работ, связанных с получением (клонированием) и выделением рекомбинантных плазмид, содержащих последовательности ДНК или фрагментов генов возбудителей.

13. Персонал, работающий в ПЦР-диагностической лаборатории должен пройти соответствующее обучение.

Основные требования, предъявляемые к организации работ в зоне выделения ДНК

1. Забор образцов производится только в одноразовые пластиковые пробирки или в стеклянные пробирки, тщательно промытые дистиллированной водой и прокаленные.

2. Используются только одноразовые перчатки и наконечники для автоматических дозаторов.

4. Обязательно меняются наконечники при переходе от одной пробы к другой.

5. Использованные пробирки и наконечники сбрасываются в одноразовые контейнеры или в специальные емкости с дезинфицирующим раствором.

6. Не рекомендуется концентрировать в рабочей зоне большие количества образцов ДНК.

7. Растворы, которые могут быть подвергнуты автоклавированию, стерилизуются в автоклаве: ЭДТА, Трис, NaCl, SDS. Если растворы были загрязнены ДНК, в условиях стерилизации она распадается на фрагменты очень низкого молекулярного веса, что делает ее неамплифицируемой.

8. Реагенты хранятся ресуспендированными на небольшие порции. Отмечается порция, которую использовали при работе с каждой серией образцов, с тем, чтобы легче обнаруживался источник загрязнения в случае, если оно произошло.

9. Избегаются разбрызгивания. Некоторые типы пробирок имеют крышки, открывающиеся с трудом, что может вызвать разбрызгивание при открывании. Перед открыванием жидкость со стенок пробирки встряхивается на вортексе.

10. В исследование каждой серии проб ДНК, включается, так называемая, «пустая» проба для контроля наличия загрязнений реагентов ДНК.

11. Используются лабораторные халаты, предназначенные для работы с неамплифицированными образцами.

Основные требования, предъявляемые к организации работ в зоне постановки ПЦР

1. Используются одноразовые перчатки и чистые халаты, которые предназначены для работы в данной зоне.

2. Реагенты для ПЦР хранятся в контейнере, который предотвращает экзогенное загрязнение. Если реагенты хранятся в холодильнике, который находится в зоне для выделения ДНК, то для них отводится специальная полка.

3. Весь используемый в работе инструментарий предназначен только для работы в этой зоне. Дозаторы, штативы, пинцет, ножницы предварительно обрабатываются спиртом. Для внесения реагентов и ДНК используются разные дозаторы.

4. Во всех случаях постановки ПЦР обязательно применяются контрольные пробы.

5. ДНК в пробирку вносится в последнюю очередь.

6. Остатки ДНК из наконечника не «выдуваются». «Выдувание» приводит к образованию аэрозоля, которым загрязняются другие пробы ДНК.

7. После добавления очередной пробы ДНК пробирка закрывается крышкой.

8. Пробирка с отрицательным контролем (реагенты без ДНК) закрывается в последнюю очередь, после того как во все пробирки ДНК уже добавлена. Таким образом, обеспечивается контроль за загрязнением реагентов во время постановки ПЦР.

9. Не прикасаться к внутренним поверхностям пробирок.

10. Использованные наконечники сбрасываются в емкость с дезинфицирующим раствором.

Основные требования, предъявляемые к организации работ в зоне детекции продуктов амплификации

1. Анализ продуктов ПЦР производится в изолированной комнате сотрудником лаборатории, не производящим обработки клинических образцов и операций с реакционной смесью. С амплифицированной ДНК обращаются осторожно, чтобы снизить вероятность ее попадания в другие зоны.

2. Перчатки, в которых работают в этой зоне, не используются для работы в других зонах.

3. Если на перчатки попала амплифицированная ДНК, то они сменяются или обрабатываются спиртом.

4. Оборудование, реактивы, халаты, перчатки, уборочный инвентарь, используемые в комнате детекции продуктов амплификации (пост-ПЦР-помещение), хранятся только в этой комнате.

5. В этой зоне необходимо работать в сменной обуви.

6. Пробирки с продуктами ПЦР открываются осторожно, не разбрызгивая содержимое.

7. Если электрофоретическая оценка неамплифицированной ДНК также проводится в этой зоне, то в эту зону вносятся лишь аликвоты геномной ДНК, предназначенные для нанесения.

8. Амплифицированная ДНК храниться отдельно от реагентов и геномной ДНК.

Перечень необходимого оборудования и расходных материалов

1. Автоматические дозаторы переменного объема (0,1-2,0 0,1-10, 20-200, 200-1000 мкл).

2. Амплификатор.

3. Бокс для ПЦР.

4. Весы аналитические и прецезионные.

5. Вортекс.

6. Горизонтальная камера для электрофореза.

7. Источник тока для электрофореза.

8. Компьютер с программным обеспечением для регистрации результатов.
9. Микроволновая печь.
10. Морозильная камера.
11. Наконечники.
12. Перчатки одноразовые.
13. Пробирки типа Эппендорф 0,2-1,5 мл.
14. pH-метр.
15. Спектрофотометр.
16. Стерилизатор.
17. Сушильный шкаф.
18. Термостат.
19. Система гель-документации.
20. Холодильник.
21. Штативы для наконечников, пробирок, дозаторов.
22. Шкаф вытяжной.
23. Центрифуга для пробирок типа «Эппендорф» (до 15000 об/мин).
24. Аквадистиллятор.
25. Бидистиллятор.
26. Измеритель водородного показателя (pH) растворов.

Перечень необходимых реактивов

1. 2-меркаптоэтанол (2-mercaptoethanol).
2. 10 x Taq-буфер (10 x Taq buffer).
3. Агароза (Agarose).
4. Акриламид (Acrylamide).
5. Ацетат аммония (Ammonium Acetate).
6. Бисакриламид (Bis Acrylamide).
7. Борная кислота (Boric acid).
8. Бромистый этидий (Ethidium Bromide).
9. Бромфеноловый синий (Bromphenol blue).
10. Бычий сывороточный альбумин (BSA).
11. Глицерин (Glycerinum).

12. Ди- и бидистилированная вода.
13. Дитиотрейтол (Dithiotreitol – DDT).
14. Додecilсульфат натрия (SDS).
15. Изоамиловый спирт.
16. Изопропанол.
17. Маркеры 100 bp, 3000 bp.
18. Персульфат аммония (PSA).
19. Перхлорат натрия (Sodium perchlorat).
20. Поливинилпирролидон (PVP).
21. Праймеры (Primers-mix).
22. Проназа (pronase).
23. Протеиназа К (Proteinase K).
24. РНК-за (RNAase).
25. Сахароза.
26. Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTP).
27. Соляная кислота (Hidrochlorid acid).
28. *Taq*-ДНК полимераза (*Taq* DNA Polymerase).
29. Тетраметилэтилендиамин (TEMED).
30. Трис (Tris base).
31. Фенол (Phenol).
32. Хлорид магния (Magnesium chloride).
33. Хлорид натрия (Natrium chloride).
34. Хлороформ (Chloroform).
35. ЦТАБ (цетилтриметиламмоний бромид).
36. Этанол 96% (Ethanol).
37. Этилен диаминтетраоцетат (ЭДТА, Трилон Б, EDTA).
38. Эндонуклеазы рестрикции (Restrictio).

ТЕМА 3. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЯДЕРНОЙ ДНК

Занятие 3. Приготовление концентрированных растворов для выделения ядерной ДНК

1. **1М ТрисНСl**, рН 7,6. Растворить 121,1 г триса в 800 мл дистиллированной воды. Довести рН до необходимого значения добавлением концентрированной соляной кислоты. Для достижения рН 7,6 необходимо добавлять постепенно при перемешивании приблизительно 35 мл концентрированной HCl. При этом постоянно измерять значение рН универсальной индикаторной бумагой или рН-метром. Перед окончательным доведением рН дать раствору остыть до комнатной температуры. Довести объем раствора до 1 л. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием.

2. **40 % NaOH**. Растворить 40 г NaOH в 60 мл дистиллированной воды.

3. **0,5М ЭДТА**, рН 8,0. Добавить 186,1 г двухзамещенной соли ЭДТА $\times 2H_2O$ к 800 мл дистиллированной воды. Интенсивно размешать на магнитной мешалке. Довести постепенно рН до 8,0 с помощью концентрированного раствора NaOH, не забывая постоянно проверять значение рН. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием. Динатриевая соль не растворяется до тех пор, пока рН раствора не будет доведен добавлением NaOH приблизительно до 8,0.

4. **5М NaCl**. Растворить 292,2 г NaCl в 800 мл дистиллированной воды. Довести объем до 1 л. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием.

5. **0,01М ацетат натрия**, рН 5,2. Растворить 1,36 г ацетата натрия трехводного в 800 мл дистиллированной воды. Довести рН до 5,2 ледяной уксусной кислотой. Довести объем до 1 л. Разлить на порции и простерилизовать автоклавированием.

6. **1M DTT.** Растворить 3,09 г DTT в 20 мл 0,01 М ацетата натрия, pH 5,2. Простерилизовать фильтрованием, разлить на порции по 1 мл и хранить при -20°C . Не автоклавировать DTT или растворы, содержащие DTT.

7. **10% SDS.** Растворить 10 г электрофоретически чистого SDS в 90 мл дистиллированной воды. Нагреть на водяной бане до 68°C , чтобы ускорить растворение. Довести pH до 7,2 добавлением нескольких капель концентрированной HCl. Довести объем до 100 мл. Надеть маску при взвешивании SDS. Раствор не стерилизовать.

8. **Бромистый этидий, 10 мг/мл.** Добавить 1 г бромистого этидия к 100 мл дистиллированной воды. Размешивать на магнитной мешалке несколько часов, пока краситель не растворится. Завернуть колбу в алюминиевую фольгу или перелить в темную склянку и хранить при 4°C . Бромистый этидий – мутаген. При взвешивании надеть перчатки и маску.

9. **0,1 М Трис-HCl, pH 8,0.** 100 мл 1 М Трис-HCl довести до 1 л дистиллированной водой.

10. **7,5 М ацетат аммония, 10 мл.** Взвесить 5,777 г соли ацетата аммония, довести до 10 мл дистиллированной водой.

11. **40% акриламида.** Приготовить навеску содержащую 60 г акриламида и 1,6 г бисакриламида. Растворить в 200 мл деионизованной воды. Возможно, для растворения раствор придется нагреть до $40-60^{\circ}\text{C}$, периодически перемешивая. Полученный раствор хранить не более 3-х месяцев при 40°C в темноте.

12. **20% ПСА.** Приготовить навеску 0,1 г персульфата аммония и растворить ее в 1 мл деионизованной воды. Хранить не более 2-х недель.

Занятие 4. Приготовление рабочих растворов для выделения ядерной ДНК

1. **6% ЭДТА.** Используется для консервации крови. 6 г ЭДТА растворить в 90 мл дистиллированной воды. Довести pH раствора до 8,0 концентрированным раствором NaOH. Довести объем раствора до 100 мл дистиллированной водой. Раствор профильтровать. Для консервации 20 частей крови брать 1 часть 6% ЭДТА.

2. **Буфер 1x STE.** Растворить 10 мл 1М Трис-HCl pH 7,6, 2 мл 0,5М ЭДТА pH 8,0 и 20 мл 5М NaCl в 968 мл дистиллированной воды.

3. **70% этанол.** 70 мл 96% этанола довести до 96 мл дистиллированной водой.

4. **80% этанол.** 80 мл 96% этанола довести до 96 мл дистиллированной водой.

5. **Раствор протеиназы К.** Растворить сухую панкреатическую протеиназу К в дистиллированной воде в концентрации 20 мг/мл. Предварительная обработка фермента не требуется. Разлить на порции. Хранить при -20°C.

6. **Раствор РНКазы.** Растворить панкреатическую РНКазу (РНКазу А) в концентрации 10 мг/мл в 10 мМ трис-HCl, pH 7,5 и 15 мМ NaCl. Прогреть 10 мин. при 95-100°C для разрушения ДНКазы и медленно охладить до комнатной температуры. Разлить на порции и хранить при -20°C.

7. **5 М перхлорат натрия.** Растворить 702 г в 800 мл дистиллированной воды. Довести объем до 1 л.

8. **T₁₀E₁₀.** 10 мМ Трис- HCl, pH-7,8; 10 мМ ЭДТА, pH=8,0.

9. **Буфер для хранения ДНК,** pH-7,5-8,0. 0,1-0,2 мМ ЭДТА; 10 мМ Трис- HCl.

10. **СИА.** 24 части хлороформа, 1 часть изоамилового спирта. Смесь стабильна и может храниться при комнатной температуре в хорошо закрытом сосуде.

Занятие 5. Выделение ядерной ДНК из растений с высоким содержанием полифенолов и полисахаридов протоколам ЦТАБ-PVP-меркаптоэтанол

1. Материал для гомогенизации массой 0,03 г, промыть под струей водопроводной, затем дистиллированной воды, хорошо подсушить промоканием фильтровальной бумагой и поместить в ступку. Если используются замороженные органы растений, то ткань залить жидким азотом в фарфоровой ступке. После испарения азота ткани растереть до порошкообразного состояния. Гомогенизацию свежих листьев проводить измельчением с помощью скальпеля в капле лизис-буфера, не допускать подсыхания гомогената. Стебли и корни растереть в фарфоровой ступке, вместе с лизис-буфером, без применения абразивного агента.

2. Чистым микрошпателью массу поместить в пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл и гомогенизировать в 1000 мкл экстракционного ЦТАБ-буфера (таблица 1), предварительно прогретого до 65°C.

Таблица 1 – Основные компоненты экстракционного буфера

Экстракционный буфер (на 1 мл буфера)	
1.4M NaCl	0,082 г
2% ЦТАБ	0,02 г
1% PVP	0,01 г
0.1M Tris-HCl, pH 8.0	0,1 мл
0.5M ЭДТА	40 мкл
0.4% β-меркаптоэтанол	14 мкл
dH ₂ O	до 1 мл

Пробирки встряхнуть несколько раз, чтобы растительная масса распределилась по поверхности лизис-буфера и погрузилась в него не сбиваясь на дне.

3. Образцы инкубировать в термостате при 65°C в течение 30 мин, периодически перемешивать раствор вращением

пробирки (трясти пробирку не рекомендуется, т.к. буфер пенится и ДНК фрагментируется).

4. Остудить пробирку до комнатной температуры, добавить равный объем смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) и перемешивать медленным оборачиванием в течение 20 мин.

5. Разделить фазы центрифугированием 15 мин (12000 g); супернатант (верхняя фаза) перенести в чистую пробирку объемом 2 мл.

6. Добавить 2/3 объема изопропанола и 1/10 объема 5 М ацетата аммония.

7. Оставить на 1 час при -20°C для осаждения ДНК.

8. Центрифугировать 15 мин (13000 g), отобрать изопропанол не касаясь на дне пробирки ДНК.

9. Добавить 1000 мкл 80%-го ледяного этанола, центрифугировать 15 мин (13000 g), удалить спирт. Данный этап повторить дважды.

10. Подсушить пробирку на воздухе для удаления следов спирта; осадок ДНК растворить в 50 мкл TE-буфера или в деионизированной воде до полного исчезновения осадка.

Занятие 6. Выделения ядерной ДНК из ткани животных перхлоратным методом

1. 0,1 г ткани промыть дистиллированной водой, измельчаются ножницами, помещаются в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

2. Добавить 200 мкл 1xSTE буфера (такая смесь может храниться в холодильнике в течение суток).

3. В пробирку добавить 75 мкл 10% SDS.

4. Добавить 10 мкл протеиназы К (свежеприготовленной), после 2-дневного хранения раствора – 12 мкл. Хорошо перемешать на вортексе.

5. Пробу поместить в термостат на 10-12 часов при 37°C .

6. К лизату добавить 8 мкл РНКазы.
7. Лизат инкубировать 1 час при 37°C.
8. В пробирку с лизатом добавить 50 мкл 5М раствора перхлората натрия.
9. В пробирку добавить 300 мкл СІА (хлороформа).
10. Содержимое пробирки интенсивно перемешать на вортексе.
11. Центрифугировать 10 мин при 13000 об/мин.
12. Верхнюю ДНК-содержащую фазу осторожно, не затрагивая промежуточного слоя, перенести в чистую 1,5 мл пробирку.
13. Повторить пункты 9, 10, 11, 12.
14. В пробирку с ДНК-содержащей фазой добавить 600 мкл 96% этанола, встряхнуть до появления «медузы» ДНК.
15. В 0,5 мл пробирку с 300 мкл 70% этанола с помощью дозатора переместить ДНК.
16. Через 5-10 мин спирт удалить и высушить ДНК до прозрачного состояния.
17. Растворить ДНК в буфере для хранения ДНК и довести концентрацию до 100-200 нг/мкл.
18. Раствор с ДНК ресуспензировать и пробирки с ДНК поместить в морозильную камеру на хранение.

Занятие 7. Выделение ядерной ДНК из эпителиальной ткани перхлоратным методом

1. Срезать дистальный конец ватного тупфера зонда в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.
2. Добавить 200 мкл 1×STE буфера, содержащего 100 мМ NaCl, 10 мМ ТРИС-НСІ (рН 8,0), 1 мМ ЭДТА (рН 8,0).
3. Затем добавить 75 мкл 10%-го раствора SDS (додецилсульфата натрия) и 12 мкл протеиназы К концентрацией 20 мг/мл. Хорошо перемешать на вортексе.
4. Пробу поместить в термостат на ночь при 37 °С.
5. К лизату добавить 8 мкл РНКазы.

6. Лизат инкубировать 1 час при 37 °С.
7. В пробирку с лизатом добавить 50 мкл 5М раствора перхлората натрия.
8. Добавить 100 мкл хлороформа (24 части хлороформа, 1 часть изоамилового спирта).
9. Очень тщательно перемешать на вортексе.
10. Центрифугировать 10 мин при 13000 об/мин.
11. Верхнюю ДНК-содержащую фазу осторожно, не затрагивая промежуточного слоя, перенести в чистую 1,5 мл пробирку.
12. Повторить пункты 9, 10, 11, 12.
13. В пробирку с ДНК-содержащей фазой добавить 300 мкл 96% этанола и центрифуговать 10 мин при 13000 об/мин.
14. Снять субнатант и добавить 150 мкл 70% этанола.
15. Через 5-10 мин спирт удалить, а пробирку перевернуть и ДНК высушивать до прозрачного состояния.
16. После высушивания ДНК растворить в 70 мкл буфера для ДНК, содержащего 0,1-0,2 мМ ЭДТА, 10 мМ Трис-НСl, рН=7,5-8,0.
17. Пробирку с ДНК поместить в морозильную камеру на хранение.

Занятие 8. Выделение ядерной ДНК из бактерий

1. Произвести отдельной колонией посев бактерий штамма *E.coli* в течение ночи с аэрацией при 37°С.
2. Добавить к осадку 300 мкл буфера TE и с помощью микропипетки перевести клетки в суспензию вновь (ресуспензировать).
3. Добавить к суспензии клеток 100 мкл 5%-ного раствора SDS и перемешать переворачиванием пробирки 3 раза.
4. Добавить 150 мкл раствора проназы (5мг/мл) и перемешать.

5. Инкубировать 1 (0,5) ч в термостате при температуре 37°C. Происходит лизис клеток и ферментативный гидролиз белков.

6. Осадить нуклеиновые кислоты из лизата спиртом. Для этого добавить в пробирку равный объем изопропанола (550 мкл) и центрифугировать при 10000 об/мин. в течение 10 минут. (После добавления спирта при необходимости можно прерваться; не центрифугировать пробу сразу, а убрать ее в холодильник. В спирте ДНК может храниться долгое время).

7. После центрифугирования отобрать микропипеткой остатки жидкости из пробирки. Растворить осадок нуклеиновых кислот в 500 мкл буфера TE и провести депротеинизацию образца, т.е. очистку ДНК от белков (пп. 9–12).

8. Добавить к раствору равный объем (500 мкл) смеси фенол-хлороформ и хорошо встряхнуть до образования стойкой эмульсии.

9. Разделить водную и органическую фазы путем центрифугирования при 10000 об/мин. в течение 5 мин. Фенол остается внизу, водная фаза с растворенной ДНК – вверху. Денатурированные фенолом белки диссоциируют с ДНК, теряют растворимость и собираются при центрифугировании на границе раздела фаз – в интерфазе. Т.е. идет экстракция ДНК из ДНП-комплекса.

10. Перенести микропипеткой водную фазу, содержащую ДНК, в чистую 2 мл пробирку. При отборе важно не забрать наконечник интерфазу – плотный слой белесого цвета между водной и органической фазами, в которой находятся агрегаты денатурированных молекул белков.

11. Провести еще одну экстракцию ДНК хлороформом и избавиться от примеси фенола. Для этого добавить в пробирку с образцом равный объем смеси CIA, перемешать и центрифугировать при 10000 об/мин. в течение 3 мин. Водную фазу перенести в чистую пробирку.

12. Оценить микропипеткой-дозатором получившийся объем водной фазы и добавить 1/25 объема 5М NaCl до конечной концентрации соли 0,2М. Затем добавить 2,5 объема холодного (-20°C) этанола для осаждения ДНК, точнее ее натриевой соли. Оставить на 1–2 ч в морозильнике при температуре -20°C .

13. Осадить нуклеиновые кислоты центрифугированием при 10000 об/мин. в течение 10 мин при максимальной скорости микроцентрифуги. Слить супернатант и промыть осадок. Для этого добавить к осадку 1 мл холодного 70% этанола и снова центрифугировать при 10000 об/мин. в течение 3 мин.

14. Слить 70% этанол, перевернуть пробирки на фильтровальную бумагу. После того как вся жидкость стечет, пробирку с осадком нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) немного подсушить на воздухе до исчезновения запаха спирта. Растворить осадок в 40-50 мкл буфера TE. Для электрофореза ДНК достаточно 5-10 мкл образца.

Занятие 9. Выделение ядерной ДНК из грибов

1. Готовят лизис-буфер. Для приготовления 10 мл буфера смешивают: 0,5М ЭДТА – 1 мл, 10% ДСН – 0,2 мл, вода дистиллированная – до 10 мл. Вещества смешивают не взбалтывая.

2. В эппендорфы объемом 1,5 мл внести 0,6-0,7 мл буфера (для пробы 50-100 мг).

3. Мицелий для гомогенизации промыть под струей водопроводной, затем дистиллированной воды, хорошо подсушить промоканием фильтровальной бумагой и поместить в охлажденную ступку.

4. Ступку залить на 2/3 жидким азотом. После испарения азота растереть грибную биомассу до состояния тонкой пудры.

5. Чистым микрошпателем массу поместить в пробирки с

лизис-буфером и инкубировать в термостате при 65°C в течение 30-40 мин.

6. Пробирки извлечь из термостата и центрифугировать 10 мин. При 3500-4000 об./мин.

7. Супернатант (верхняя фаза) перенести в чистые пробирки объемом 1,5 мл.

8. Добавить 1/6 объема смеси 3М ацетата калия+5М уксусная кислота.

9. Эппендорфы оборачивать пару раз и поместить в холодильник (4°C) на 30 мин.

10. После этого пробирки центрифугировать 10 мин. при 11000-12000 об./мин. надосадок отобрать в новые пробирки.

11. Добавить 1 объем изопропанола и 1/10 объема 7,5М ацетата аммония от добавленного количества изопропанола. Аккуратно оборачивать эппендорфы пару раз.

12. Оставить на 15-20 мин. при -20°C.

13. Добавить в каждую пробирку 300-600 мкл 80%-го ледяного этанола. Аккуратно оборачивать эппендорфы пару раз, центрифугировать 3-5 мин 1000-12000 об./мин, удалить спирт. Промокнуть края фильтровальной бумагой.

14. Подсушить пробирки на воздухе для удаления следов спирта.

15. Осадок ДНК растворить в 500-600 мкл ТЕ-буфера.

Разрушение РНК

1. Для удаления РНК продукт экстракции инкубировать с ферментом РНКазой. Фермент добавить из расчета 5 мкл раствора фермента с концентрацией 10 мкг/мкл на 600-700 мкл раствора нуклеиновых кислот в эппендорфе. Поместить в термостат при 37°C на 20-30 мин.

2. Добавить 1 объем насыщенного фенола с хлороформом и плавно оборачивать 100 раз.

3. Центрифугировать 10 мин при 10000-12000 об./мин.

4. После откручивания содержимое пробирок расслаивается на три фазы. Верхнюю слегка вязкую водную фазу

отобрать в новые пробирки.

5. Добавить равный объем смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24:1) и перемешивать медленным оборачиванием 100 раз.

6. Центрифугировать 10 мин при 10000-12000 об./мин. Повторить процедуру промывания и откручивания два раза.

7. Происходит разделение смеси на две фазы, надосадок отобрать в новые пробирки.

8. Добавить в каждую пробирку 2 объема 96%-го ледяного этанола и 1/10 объема 2М ацетата натрия. Смесь поместить на 20-30 мин. в морозильник.

9. Центрифугировать 10-12 мин 12000 об./мин.

10. Добавить в каждую пробирку 300-600 мкл 80%-го ледяного этанола. Аккуратно оборачивать эппендорфы пару раз, удалить спирт. Промокнуть края фильтровальной бумагой. Данный этап повторить дважды.

11. Подсушить пробирки на воздухе или 5-10 мин. при 37°C в суховоздушном термостате для удаления следов спирта.

12. Сухой осадок ДНК растворить в 50-200 мкл ТЕ-буфера или в деионизированной воде до полного исчезновения осадка.

.

ТЕМА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК И СТЕПЕНИ ЕЕ ОЧИСТКИ

Занятие 10. Спектрофотометрическое определение концентрации и очистки ДНК. Электрофоретическое определение концентрации ДНК. Разведение и хранение образцов ДНК

Точное измерение концентрации ДНК проводится стандартной методикой по объему 1-1,5 мкл полученного экстракта в 1-3 повторностях на спектрофотометре NanoDrop 1000, при длине волны 260 нм. Пик поглощения должен находиться именно на этой длине волны (рисунок 14). Нуклеиновые кислоты высокой очистки имеют отношение поглощений 1,85-2,0.

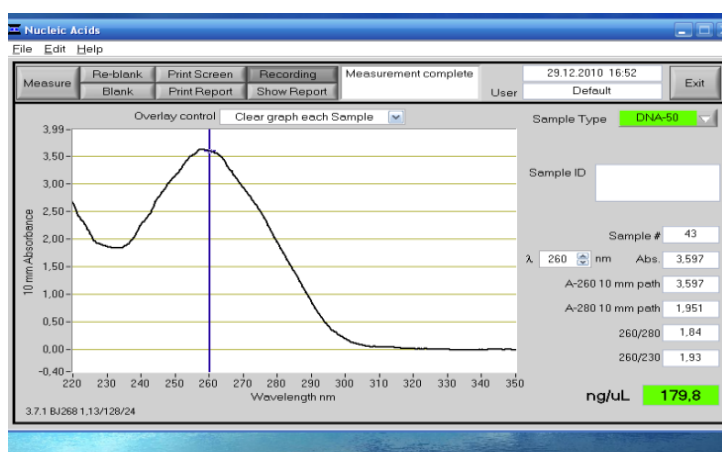


Рисунок 14. – Результат определения концентрации ДНК на спектрофотометре Nanodrop 1000

Приблизительную оценку качества экстракта и выявление степени деградации молекул в препарате определяют по интенсивности флуоресценции в УФ-свете и отсутствию «шлейфа» после связывания нуклеиновых кислот с бромистым этидием в ходе горизонтального электрофореза в 0.8%

агарозном геле в $1\times$ буфере, при напряжении 80-90 V, в течение 20-40 мин. Для внесения нуклеиновых кислот в лунки и наблюдения за динамикой фореа применяется загрузочный краситель. В качестве маркера используется ДНК известной концентрации (рисунок 15).

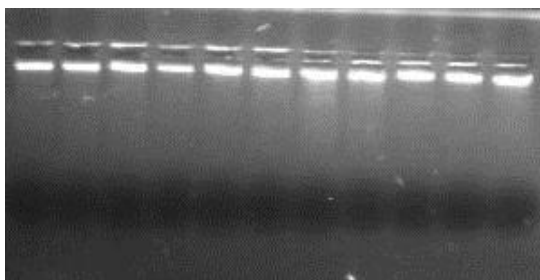


Рисунок 15. – Результаты определения концентрации и степени очистки ДНК методом электрофореза

ДНК хорошего качества должна светиться в виде довольно компактной полосы высокой молекулярной массы, не смазанной по длине дорожки.

Приготовление растворов для проведения геле-электрофореза:

1. Буфер 10 x TBE (трис-боратный). На 50 мл требуется 5,4 г трис, 2,75 г борной кислоты, 0,372 г ЭДТА, довести до требуемого объема дистиллированной водой (pH=8,3).

2. Буфер 1 x TBE (трис-боратный). На 1 литр требуется 10,8 г трис, 5,5 г борной кислоты и 0,93 г ЭДТА. Довести до требуемого объема дистиллированной водой (pH=8,3).

3. 0,8% агарозный гель. Растворите 0,128 г агарозы в 1,6 мл 10 x TBE-буфера и в 14,4 мл воды. Нагрейте до 100°C для растворения агарозы, постоянно перемешивая раствор, и медленно охладите до 40-50°C. Добавьте в раствор агарозы бромистый этидий до конечной концентрации 0,4 мкг/мл. Затем с помощью специальной кюветы и гребенки сформируйте гель с лунками.

4. Основные прописи буфера для внесения пробы в гель:
- а) 5 мл глицерина, 0,042г бромфенолового синего, 10 мл дистиллированной воды;
 - б) 25 мл дистиллированной воды, 0,05г бромфенолового синего, 12г сахарозы.
- Хранить буфер при 4°C.

ТЕМА 5. ПОСТАНОВКА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Занятие 11. Молекулярные основы и постановка обычной ПЦР. Компоненты ПЦР-реакции, их концентрации и разведения. Этапы ПЦР. Подбор программы амплификации, работа с ДНК-термоциклером

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий многократно избирательно копировать определенные участки нуклеиновой кислоты (ДНК) при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце.

Метод ПЦР основан на механизме репликации ДНК *in vivo*: двухцепочечная ДНК раскручивается до одноцепочечной, дублируется и снова закручивается. Эта методика состоит из повторяющихся циклов:

- денатурация ДНК путем плавления при повышенной температуре для превращения двухцепочечной ДНК в одноцепочечную ДНК;
- отжиг (гибридизация) двух олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров для целевой ДНК;
- удлинение цепи ДНК, начиная от праймеров, путем добавления нуклеотидов с использованием ДНК полимеразы в качестве катализатора и в присутствии ионов магния.

Реакция ПЦР проводится в программируемом термостате (амплификаторе) – приборе, который может проводить достаточно быстро охлаждение и нагревание пробирок (обычно с точностью не менее 0,1°C). Амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта» и последующего хранения.

При проведении амплификации основными компонентами реакционной (ПЦР) смеси являются: ПЦР-буфер, $MgCl_2$, смесь нуклеозидтрифосфатов, праймеры (олигонуклеотиды), термостабильная ДНК-полимераза, препарат анализируемой ДНК. Каждый из компонентов реакционной смеси непосредственно участвует в полимеразной цепной реакции, а концентрация реагентов напрямую влияет на ход амплификации.

Хлорид магния ($MgCl_2$) является одним из ключевых компонентов реакционной смеси для ПЦР, во многом определяя специфичность реакции и выход ее конечного продукта. Положительно заряженные ионы магния взаимодействуют с отрицательно заряженными молекулами других компонентов реакции, например с фосфатными группами, присутствующими в ДНК-матрице, праймерами, которые, несмотря на то, что они одноцепочечные, тоже являются фрагментами ДНК и имеют сахарофосфатную основу, что дает им отрицательный заряд. Но решающее значение имеет взаимодействие с дНТФ, каждый дезоксинуклеотид в смеси которой несет в общей сложности четыре отрицательно заряженных молекулы кислорода, прикрепленные к группе трифосфата. Поэтому следует учитывать то, что реальная концентрация активных (связавшихся с нуклеотидами) ионов в реакционной смеси может быть иной, чем задана изначально исследователем. Более того, на конечную концентрацию хлорида магния в реакционной смеси оказывает влияние количество циклов заморозки-разморозки, которые приводят к выпадению части соли в осадок. При ПЦР ионы магния связываются с мононуклеотидами в молярном соотношении 1:1 и образуют комплексы, которые являются субстратом для *Taq*-полимеразы. Но на практике результаты ПЦР не будут оптимальны при концентрации магния равной или менее чем общая концентрация свободных нуклеотидов. В реакционной смеси требуется в среднем в 2 раза большее количество ионов магния.

Хлорид магния применяется в диапазоне концентраций 0,5-5 мМ. Повышение концентрации реагента увеличивает

выход продукта, но высокими темпами понижает специфичность, т.е. повышает вероятность некомплементарной гибридизации праймеров, увеличивает выход неспецифичных продуктов и содействует ошибочным встройкам нуклеотидов. Кроме того, повышение концентрации повышает температуру плавления ДНК. При большом избытке Mg^{2+} (до 10мМ) на 40-50% ингибируется *Tag*-полимераза.

Понижение концентраций реагента вызывает ингибирование реакции, уменьшение T_m взаимодействия праймера с матрицей и, соответственно, низкий выход ПЦР-продукта.

Реактив хранят в морозильнике.

дНТФ (dNTP). Нуклеозидтрифосфаты являются непосредственными мономерами нуклеиновых кислот. Для предотвращения цепной терминации рекомендуется равноколичественное соотношение всех четырех нуклеотидтрифосфатов (дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ). Диапазон конечных рабочих концентраций – 10-500 мкМ. Подходящую концентрацию подбирают эмпирически, с учетом того, что в ходе ПЦР происходит включение не более 50% дНТФ из раствора. Низкая концентрация данных компонентов реакционной смеси (10-20 мМ) увеличивает вероятность ошибки при построении комплементарной цепи ДНК. Повышенная концентрация дНТФ при нормальной концентрации $MgCl_2$ может ингибировать ПЦР и приводить к пониженному выходу ПЦР-продукта. Тем не менее, для синтеза более длинных ПЦР-фрагментов может потребоваться более высокая концентрация реагента.

Субоптимальная концентрация нуклеотидов может привести к неполному удлинению праймера на матрице целевой нуклеиновой кислоты или преждевременному завершению синтеза ДНК во время стадии удлинения цепи.

Смесь дНТФ поставляется в виде раствора в рабочей концентрации (2-2,5 мМ), в виде концентрированного раствора (10 мМ на каждый моноклеотид). Для разведения 10

мМ раствора до 2,5 мМ необходимо смешать 100 мкл дНТФ и 300 мкл воды *milliQ*. Реактив хранят в морозильнике.

ДНК-матрица. Анализируемый образец – это подготовленный к внесению в реакционную смесь, разведенный до нужной концентрации препарат ДНК, служащий мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

Для одной ПЦР берется ДНК в количестве от 3 до 1000 нг обычно 10-200 нг. Оптимальная молярность подбирается опытным путем, по наличию хорошо читаемых и немногочисленных полос на ПЦР-профиле. Избыточное количество образца ДНК ингибирует ПЦР либо, при большом числе циклов амплификации, может привести к накоплению неспецифических продуктов. При малом количестве ДНК-матрицы с высокой вероятностью будет наблюдаться отсутствие ПЦР-продукта вследствие деградации ее по любой из перечисленных причин: свертывание, адсорбция, химическое или ферментативное разложение.

Для ПЦР готовят рабочий раствор ДНК-матрицы необходимой концентрации: отбирают из исходного раствора (образца) объем согласно пропорции разведения, и добавляют воду *milli Q*. Разведенную ДНК, также как и исходную хранят в морозилке.

ДНК-праймеры. Праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 5 до 30 п.н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и ограничивает начало и конец амплифицируемого участка.

Обобщенно праймеры делят на два класса: специфические праймеры, или праймеры для направленной ПЦР, кон-

струируемые специально для амплификации заданного фрагмента генома, состоящие из 10-30 нуклеотидов, и случайные (неспецифические) праймеры, которые сочиняются произвольно, и состоят из 5-11 нуклеотидов.

Последовательность праймера определяет целый ряд показателей, таких как длина продукта, его температура плавления и отжига, а так же концентрация. Праймеры не должны быть слишком короткими. Праймеры конструируют с температурой отжига примерно на 5°C ниже, чем температура плавления.

Синтез праймера по заданной последовательности нуклеотидов не представляет технической сложности и осуществляется в автоматических синтезаторах.

Плохо сконструированный праймер может привести к малому количеству продукта, или его отсутствию, вследствие неспецифической амплификации

Для ПЦР-смесей используют праймеры в концентрациях 0,1-1 мМ (4-10 пикомоль на одну ПЦР-реакцию). Они поставляются производителями с паспортом, т.е. количественными характеристиками, из которых наиболее важна концентрация.

Сток-раствор и аликвоты хранят в морозильной камере, в центрифужных пробирках объемом 1,5 или 2 мкл, в виде раствора в *milli Q*. Олигонуклеотиды выдерживают несколько размораживаний без ущерба для их качества. Отбор аликвот позволяет размораживать сток-раствор значительно реже.

ДНК-полимераза Термоустойчивая ДНК-полимераза – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

Максимальная активность фермента проявляется при температуре 70-74 °C (хотя фермент может работать и при более низких температурах).

ДНК-полимеразу считают холоферментом, поскольку для нормального функционирования она требует присутствия

ионов магния в качестве кофактора. Точность *Taq*-полимеразы зависит от концентрации Mg^{2+} , сбалансированности дНТФ и pH реакционной среды.

Количество ДНК-полимеразы должно быть оптимально. Если используется слишком маленькое количество *Taq*-полимеразы, выход продукта снижается, причем это снижение тем серьезнее, чем больше размер продукта. При избытке *Taq*-полимеразы появляются неспецифические продукты.

Термоустойчивая ДНК-полимераза выпускается в пробирке, содержащей от 500 до 5000 единиц, с концентрацией 5 ед./мкл. В разных случаях ПЦР-анализа применяется 0,5-5 ед. Хранят реактив в морозилке.

Реакционный раствор (буфер) Буфер – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающей оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH.

Состав буфера зависит от типа и характеристики фермента, который предполагается использовать, и большинство поставщиков обычно предоставляют 10x (десятикратный) буфер. Наиболее обычный реакционный буфер, используемый с *Taq*-полимеразой содержит: 10 mM Tris, pH 8,3; 50 mM KCl. Вместо KCl в буфер можно внести NaCl или сульфат аммония. Хранят реактив в морозилке.

Программа амплификации.

Предварительный нагрев.

Предварительный нагрев обеспечивает полную денатурацию матрицы, а так же инактивацию каких-либо посторонних белков, присутствующих в пробе. Начальная денатурация проводится при температуре от +92°C до +96°C на протяжении 0,5-10 мин. Температура и продолжительность этого этапа во многом определяется характеристиками матрицы. Если матрица примерно на 50% состоит из ГЦ нуклеотидов, то для ее полной денатурации достаточно 1-3 мин. при +95°C. Однако если она обогащена ГЦ нуклеотидами, то для ее пол-

ной денатурации может понадобиться более продолжительное время и высокая температура.

Первый этап цикла: денатурация.

Денатурация проводится при температуре от $+92^{\circ}\text{C}$ до $+95^{\circ}\text{C}$ на протяжении 30-120 сек (3-4 мин если матрица обогащена ГЦ нуклеотидами).

Второй этап цикла: «отжиг».

«Отжиг» проводится при температуре $+37-65^{\circ}\text{C}$ на протяжении 10-120 сек. При этом следует учитывать, что чем выше температура «отжига», тем выше специфичность ПЦР. Но как только она превышает некую критическую величину (для данной пары праймеров), то выход конечного продукта начинает резко падать. В целях оптимизации выхода продукта ПЦР, температуру отжига определяют экспериментальным путем. Работа заключается в проведении ряда амплификаций при разных температурах. Диапазон для выбора оптимальной температуры отжига (T_a) праймера может быть представлен несколькими вариантами с градиентным повышением и понижением на полградуса от 45°C . Это наиболее легко выполнить, используя градиентный термоамплификатор.

Третий этап цикла: элонгация.

Элонгация проводится при температуре $+72^{\circ}\text{C}$ на протяжении 10-120 сек. Указанная температура соответствует температурному оптимуму *Taq*-ДНК-полимеразы. Продолжительность этапа элонгации определяется размером амплифицируемого фрагмента и скоростью работы *Taq*-ДНК-полимеразы.

В стандартном варианте ПЦР обычно используется 25-45 циклов амплификации. Слишком большое число циклов амплификации чревато насыщением реакции. При этом могут синтезироваться длинные продукты, образованные в результате использования в качестве праймера готового продукта, а так же возможно накопление одноцепочечных продуктов и синтез коротких продуктов (из-за истощения запаса нуклеотидов в реакционной смеси).

Пост-ПЦР – дополнительный цикл амплификации, в котором этап элонгации удлинён до 5-30 мин. При этом возможно превращение некоторого остаточного количества одноцепочечных фрагментов в двухцепочечные и удлинение двухцепочечных продуктов ПЦР по 3'-концам.

Занятие 12. RAPD-ПЦР-анализ с произвольным праймером

RAPD (random amplified polymorphic DNA) включает в себя проведение полимеразной цепной реакции с использованием 10-нуклеотидного праймера с произвольной нуклеотидной последовательностью. Продукты RAPD анализа образуются в результате амплификации фрагмента геномной ДНК, фланкированного инвертированной последовательностью данного праймера (таблица 2).

Таблица 2 – Состав реакционной смеси для RAPD-ПЦР и концентрации используемых реактивов в расчёте на общий объём 25 мкл

Компоненты	Концентрация на 1 пробу
10× ПЦР-буфер	2,5 мкл
50 мМ MgCl ₂	2,5 мкл
10 мМ смесь дНТФ	1,2 мкл
10 пмоль/мкл праймер ОРА	1,0 мкл
2 ед. <i>Taq</i> -полимеразы	0,1 мкл
ДНК / 30 нг/мкл	1,0 мкл
H ₂ O	до 25 мкл

Для праймеров серии ОРА применяется следующая программа амплификации (таблица 3):

Таблица 3 – Программа амплификации для RAPD-ПЦР

Стадия	Температура, °С	Время, сек.	Количество циклов
Первичная денатурация	96	300	1
Денатурация	94	60	40
Отжиг	35– 45	45	40
Элонгация	72	120	40
Заключительная элонгация	72	420	1
Остановка реакции	4	∞	1

Недостатки RAPD-анализа: низкая температура отжига увеличивает вероятность образования продуктов амплификации с большим количеством неспаренных оснований; «произвольные» (случайные) маркеры, обладают доминантным характером проявления и не могут быть использованы при типировании гомозиготных и гетерозиготных амплифицированных образцов; низкая воспроизводимость результатов; высокая чувствительность к изменениям условий реакций, поэтому достоверные результаты можно было получить лишь при максимальной стандартизации условий и большой выборке образцов.

Занятие 13. ISSR-ПЦР-анализ с использованием пяти праймеров (UBC 808,818, 824, 845, 867)

ISSR (inter-simple sequence repeat) – это область генома между двумя соседними, противоположно ориентированными микросателлитами. Для ISSR-анализа применяют, как правило, один или несколько праймеров длиной 15-24 нуклеотида, состоящих из 2-4 tandemных нуклеотидных повторов, комплементарных микросателлитному участку ДНК. Однако, для достижения высокоспецифичных результатов 5'-или 3'-концы праймеров необходимо закреплять с помощью селективных нуклеотидов (так называемый «якорь»). В противном случае у праймера не будет определенного сайта ло-

кализации, и внутри целевой микросателлитной ДНК он будет гибридизоваться с ней во множестве вариантов. В результате ампликоны будут синтезироваться разной длины, и их невозможно будет идентифицировать на электрофореграмме. В то же время «заякоренные» праймеры позволяют амплифицировать фрагменты ДНК (как правило, уникальные), находящиеся даже между двумя достаточно близко расположенными микросателлитными последовательностями. В результате ПЦР с такими праймерами может быть синтезировано большое число фрагментов, хорошо различимых по их молекулярной массе.

ISSR-метод обладает хорошей воспроизводимостью и может быть с успехом использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации видов, популяций, линий, а в ряде случаев – и для индивидуального генотипирования. Большое количество микросателлитных повторов в геноме повышает вероятность обнаружения полиморфных локусов, а так же меньше затрат, с точки зрения времени и денег, делает маркеры универсальным инструментом для генетического анализа. Поэтому использование ISSR маркеров эффективно не только при работе с мало изученными генотипами, когда информация о структуре генома минимальна или отсутствует, но и в качестве вспомогательного метода, для получения более полной информации о степени генетического полиморфизма.

Стандартную реакционную ISSR-ПЦР-смесь можно готовить двумя способами: первый – с использованием общего ПЦР-премикса, все компоненты, кроме ДНК-матрицы, готовятся в виде общей смеси, разделяемой затем на равные части по числу реакционных пробирок, а ДНК вносится отдельно на дно пустых пробирок. Второй вариант это поэтапное покапельное внесение отдельных реагентов в каждую пробирку.

При постановке опыта с одинаковой ДНК-матрицей и разнесением по пробиркам общего ПЦР-премикса (без ДНК)

наблюдается достаточно высокая воспроизводимость ISSR-профилей. Использование этого приема позволяет работать с относительно большим количеством повторностей, сберегает время, а также снижает риск загрязнения сток- и конечного раствора. Однако, приготовление премикса более, чем для десяти проб, из-за неравномерного перемешивания реагентов снижает качество некоторых профилей.

Для научно-исследовательской работы предпочтительней использовать метод отдельного внесения реагентов в каждую пробирку, который позволяет получить более высокую воспроизводимость ISSR-профилей.

Состав реакционной смеси для ISSR-ПЦР и концентрации используемых реагентов в расчете на общий объем 25 мкл представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Состав реакционной смеси для ISSR-ПЦР и концентрации используемых реагентов в расчете на общий объем 25 мкл

Компоненты	Концентрация на 1 пробу
10× ПЦР-буфер «А» с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,5 мкл
50 мМ MgCl_2	1,25 мкл
10мМ смесь дНТФ	1,3 мкл
20 пмоль/мкл праймер UBC	1,0 мкл
2 ед. <i>Taq</i> -полимеразы	0,2 мкл
ДНК / 20 нг/мкл	1,0 мкл
H_2O	до 25 мкл

Характеристики микросателлитных праймеров, использованных для генотипирования представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристики микросателлитных праймеров, использованных для генотипирования

Праймер	Последовательность 5'→3'	Температура отжига T_m , °C	GC, %
UBC 808	AGAGAGAGAGAGAGAGC	46.5	53
UBC 818	CACACACACACACAG	50	53
UBC 824	TCTCTCTCTCTCTCG	50	53
UBC 845	CTCTCTCTCTCTCTRG	50	50
UBC 867	GGCGGCGGCGGCGGCGGC	46.5	100

Для праймеров серии UBC применяется следующие программы амплификации (таблицы 6, 7):

Таблица 6 – Программа амплификации для праймеров UBC 818, UBC 824 и UBC 845

Стадия	Температура, °C	Время, сек.	Количество циклов
Первичная денатурация	94	30	1
Денатурация	94	60	40
Отжиг	50	60	40
Элонгация	72	60	40
Заключительная элонгация	72	300	1
Остановка реакции	4	∞	1

Таблица 7 – Программа амплификации для праймеров UBC 808 и UBC 867

Стадия	Температура, °C	Время, сек.	Количество циклов
Первичная денатурация	94	600	1
Денатурация	94	60	35
Отжиг	46.5	60	35
Элонгация	72	120	35
Заключительная элонгация	72	300	1
Остановка реакции	4	∞	1

ТЕМА 6. ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР

Занятие 14. Молекулярные основы электрофореза нуклеиновых кислот. Правила техники безопасности

Гель-электрофорез – это метод, который служит для разделения макромолекул на основе их размера, электрического заряда и других физических свойств. Принцип метода заключается в следующем. Находящиеся в буферном растворе макромолекулы обладают некоторым суммарным электрическим зарядом, величина и знак которого зависят от рН среды. Если через этот раствор, заключенный в канал из изолирующего материала, например стеклянную трубку, начать пропускать электрический ток, то вдоль канала установится определенный градиент напряжения, т. е. сформируется электрическое поле. Его напряженность измеряется разностью потенциалов по концам рабочего канала (или его участка), отнесенной к его длине (В/см). Под действием поля макромолекулы в соответствии со своим суммарным зарядом мигрируют в направлении катода или анода, причем их трение об окружающую среду ограничивает скорость миграции. В зависимости от величины заряда и размеров молекулы приобретают разные скорости. Постепенно исходный препарат, состоявший из различных молекул, разделяется на зоны одинаковых молекул, мигрирующих с одной и той же скоростью.

В настоящее время используют ПААГ (полиакриламидный гель) и агарозный гель. Варьируя концентрацию полимера, можно получать гели с очень широким диапазоном размеров пор. Кроме того, можно изменять электрические заряды макромолекул путем вариации рН буфера, а их конфигурацию путем введения в буфер денатурирующих агентов или детергентов.

Правила безопасности:

1. Бромистый этидий обладает сильным мутагенным действием. Работа с указанным веществом, а так же со всем оборудованием и растворами, соприкасающимися с гелями, проводится в перчатках и с соблюдением всех мер предосторожности.

2. Акриламид является потенциальным нейротоксином, проникает через кожу и имеющим аккумулятивное действие. Работу с акриламидом проводят под тягой, в перчатках.

3. При работе с прибором для электрофореза, его всегда следует накрывать изолирующей крышкой, так как можно получить удар током, случайно дотронувшись до буфера.

4. Всегда следует проверять отключение прибора, прежде, чем извлекать гель из буфера.

Занятие 15. Визуализация продуктов ПЦР методом горизонтального электрофореза

Электрофорез в агарозном геле является стандартным методом, используемым для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. Эта методика проста, быстро осуществляется, и способна разделять фрагменты ДНК, которые не могут быть разделены надлежащим образом с помощью других процедур. Локализация ДНК в геле может быть определена путем окрашивания бромистым этидием – флуоресцентным интеркалярным красителем, в низких концентрациях.

Так как основная часть мощности, производимая в процессе электрофореза, растрачивается в виде тепла, могут возникать следующие нежелательные эффекты:

1. Возросшая скорость диффузии ионов исследуемого образца и буфера, приводящая к расширению зоны разделяемого образца;

2. Образование конвекционных токов, что приводит к перемешиванию разделенных образцов;

3. Термическая нестабильность образцов, которые более чувствительны к нагреванию (например, денатурация ДНК);

4. Уменьшение вязкости буфера, приводящее к снижению сопротивления среды;

5. Прохождение тока высокого напряжения через буфер вызывает его разогрев, что особенно значительно при длительных форезах, при этом ДНК начинает терять бром этидий и полосы бледнеют.

Проведение электрофореза:

1. В сухую пластиковую подложку для геля вставить гребенку так, чтобы при добавлении агарозного раствора образовались лунки.

2. Готовый горячий гель быстро залить в подложку. Гель не должен содержать комков, неоднородных участков и пузырьков, расположенных по будущим дорожкам движения ДНК.

3. После застывания геля, аккуратно извлечь гребенку.

4. Продукты ISSR-ПЦР – ампликоны (5-7 мкл) смешать с загрузочным красителем (1-2 мкл) в микроуглублениях плашки для иммуноферментного анализа.

5. Для определения размера разделяемых фрагментов их электрофоретическую подвижность сопоставляют с подвижностью фрагментов известной длины. ДНК-маркер (0,7-1,5 мкл) так же смешивается с красителем (1-2 мкл).

6. Наконечником пипетки отобрать смесь, осушая углубление, и перенести в лунку агарозного геля.

7. Гель поместить в систему для горизонтального электрофореза, заполненную 1х буфером до максимальной отметки.

8. Сверху надеть крышку с электродами, следя за соблюдением полярности (цвет клемм на камере должен совпадать с цветом электродов на крышке).

9. Подключить источник питания Эльф-4, задать нужные параметры подаваемого напряжения или силы тока и запустить процесс. Обычно электрофорез проводят при стартовом напряжении 90 В и основном напряжении фореза 50 В, в течение 90-160 мин.

Результатом проведения электрофореза является электрофореграмма, картина, полученная после разделения сложной смеси.

Занятие 16. Метод вертикального электрофореза. Особенности электрофореза в полиакриламидном геле. Приготовление буфера для электрофора. Нанесение ампликонов в лунки

Полиакриламидный гель (ПААГ) обладает многими качествами идеального носителя. Имея свойства молекулярного сита, он обеспечивает электрофоретическое разделение смесей не только по заряду, но и по размеру и форме частиц. При электрофорезе в ПААГ крупные молекулы, размеры которых соизмеримы с диаметром пор геля, движутся медленнее, а мелкие молекулы свободно и быстро проходят через поры геля. Меняя концентрацию акриламида от 2 до 50% можно задать определенную пористость геля. Например, диаметр пор в геле, содержащем 7,5% акриламида, равен 5 нм, а 30% акриламида – 2 нм. При выборе концентрации геля учитывают среднюю молекулярную массу (M_r) разделяемых веществ и форму их молекул.

Акриламидный гелевый электрофорез проводится в аппарате для вертикального электрофореза.

1. Для приготовления 6 мл 2% геля взять 1,2 мл 40% акриламида, 0,6 мл 10х ТБЕ-буфера, 30 мкл 20% ПСА, 4,17 мл воды дистиллированной, 3 мкл TEMED.

2. Компоненты смешать, последним добавляют TEMED, т.к. после него начинается процесс полимеризации и затвердевания.

а) Персульфат аммония постепенно разлагается, в водных растворах весьма быстро. При растворении персульфат производит характерное пощелкивание. Если 1%-ный раствор персульфата в воде имеет $pH < 2$, или при растворении не слышно щелчков, то персульфат непригоден.

б) Персульфат способен окислять разделяемые вещества, что может привести к появлению дополнительных полос или инактивации ферментов. Поэтому перед опытом рекомендуется провести электрофорез без нанесения пробы с целью удаления лишнего персульфата.

3. Залить гель между стекол в наклонном положении (примерно 2/3 объёма), вставить гребенку. После затвердевания формируются углубления в виде “карманов” объёмом 40 мкл каждый.

4. Путем пипетирования пробы ампликонов (3-4 мкл) смешать с загрузочным красителем (1-1,5 мкл) и внести в лунки геля.

5. Стекла с гелем поместить в ванночку. Сверху надеть крышку с электродами, следя за соблюдением полярности (цвет клемм на камере должен совпадать с цветом электродов на крышке). Обычно электрофорез проводят при значении напряжения 120-180 В.

ТЕМА 7. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В УФ-СВЕТЕ

Занятие 17. Применение трансиллюминатора. Безопасность работы. Окончательная обработка электрофоретических профилей с помощью компьютерных программ. Принципы чтения ПЦР-профилей

Трансиллюминатор представляет собой прибор, состоящий из ламп, испускающих ультрафиолетовый свет и кварцевого стекла (такое стекло используется, поскольку оно пропускает ультрафиолетовые лучи). Так как излучение в ультрафиолетовом диапазоне является небезопасным для глаза, то наблюдение ведется только в специальных очках и маске, приспособленных для этих целей. Ультрафиолетовый свет применяется с целью детекции фрагментов ДНК, разделенных в агарозном геле и связанных со специальным красителем – бромистым этидием, который поглощает свет в указанном диапазоне. Благодаря этому становится возможным наблюдение фрагментов ДНК и определение их размеров, а также получение их в препаративных количествах для последующего использования.

Для получения высококачественного изображения геле-электрофореграмм в настоящее время существуют комплексы, позволяющие производить цифровую фотосъемку в условиях “темной комнаты” при строго заданных параметрах падающего света, а затем с помощью программного обеспечения улучшать качество полученного изображения и использовать это изображение для анализа и удобного представления электрофоретических данных. Примером такого комплекса является геле-документирующая система QUANTUM ST4 (Франция).

Отработанный гель помещают в прибор, вращая кольца блока оптики, расположенные под фотокамерой на верхней

стенке “темной комнаты”, подбирают увеличение, фокус и апертуру, оптимальные для четкости изображения. Закрытие апертуры делает изображение темнее, изменение фокуса меняет четкость изображения. Изменяя увеличение, добиваются, чтобы вся пластина геля уместилась или увеличилась на экране монитора. По истечении времени экспозиции получают изображение геля, сохраняют его в формате JPEG.

Окончательную обработку ISSR-профилей можно произвести в программе Adobe Photoshop PS v.12, по необходимости с применением редактирования оттенков серого, инверсии изображения, выравнивания линии старта по горизонтали. Для сопоставления профилей применить инструмент «горизонтальные направляющие».

Количество ампликонов в каждой из фракций оценивают визуально и программно-аппаратно по флуоресценции интеркалирующего красителя (интенсивности и плотности свечения каждого фрагмента) относительно таковых стандартного ДНК-маркера, который в данном случае будет выступать в качестве калибровочной кривой. При этом за стартовую точку принимают нижнюю границу лунки, за финишную – максимальную область флуоресценции каждой из фракций.

На миллиметровой бумаге выбирается масштаб, например, одна клетка равна одному миллиметру. На оси У отмечают стандарты размера фрагментов ДНК, т.е. 1000 п.н. будет равна 10 см, 500 п.н. соответственно 5 см. Линейкой измеряют расстояние от стартовой точки до тех же маркеров на экране и переносят на ось Х. Отмечаются точки пересечения, по которым строится калибровочная кривая.

Расстояние от стартовой точки до фрагмента изучаемых профилей точно также фиксируется на оси Х, проецируется на кривую, а от нее на ось У. По выбранному масштабу определяется его размер.

Наиболее оптимальным подходом считается учет всех полос высокой и средней интенсивности.

ТЕМА 8. ЭЛЮЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ИЗ ГЕЛЕЙ АГАРОЗЫ

Занятие 18. Применение метода «ловчей лунки». Выделение ДНК после гомогенизации геля через иглу

Метод «ловчей лунки»

1. В сухую пластиковую подложку для геля вставить две гребенки, закрепленные между собой клейкой лентой так, чтобы при добавлении агарозного раствора образовались лунки точно друг напротив друга. Способ получения лунок показан на рисунке 17.

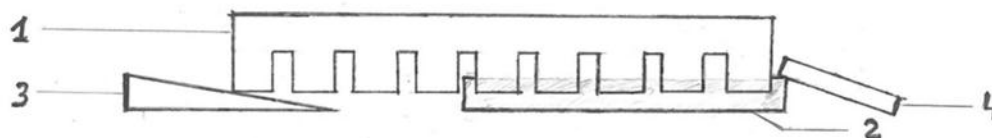


Рисунок 17.— Получение лунок одинаковой глубины в агарозном геле

1 – сдвоенная гребенка; 2 – форма с гелем; 3 – клин; 4 – груз

2. Готовить 1 % агарозный гель (agarose 0,16 г, 10×TBE 16 мл, H₂O 14 мл).

3. Залить раствор на подложку для геля, и дать гелю застыть. Количество использованного геля должно соответствовать образованию слоя толщиной около 3-5 мм.

4. После того, как гель полностью сформировался, аккуратно удалить гребенки и поместить гель в электрофоретическую камеру с 1х TBE буфером, так чтобы гель был покрыт слоем буфера около 5-7 мм.

5. Смешать в плашке 10 мкл ампликона и 3 мкл сахарозы и добавить в лунку.

6. Установить постоянное напряжение электрофореза 80 В.

7. За продвижением полосы ДНК следить с помощью прибора Quantum ST4 под УФ. В момент нахождения целевого фрагмента в «лунке-ловушке» собрать раствор из лунки.

8. Для контроля смесь реампликона (6 мкл) и агарозы (3 мкл) добавить в лунку геля. При напряжении электрофореза 80 В дождаться вхождения ДНК в гель. Через 5 мин проверить наличие отобранного реампликона под УФ.

9. Собранный раствор из лунки хранить при -20°C .

Выделение ДНК через иглу

Гель агарозы представляет собой переплетение не сшитых между собой химически пучков нитей, образующих крупнопористую пространственную решетку. Такое своеобразие структуры позволяет осуществить, в частности, выдавливание жидкости из геля вместе с растворенной в ней ДНК.

Относительно небольшие (устойчивые к действию срезающих сил) молекулы ДНК можно извлечь из агарозы после энергичной гомогенизации геля путем продавливания его через иглу шприца 26-го калибра.

1. Нужный фрагмент ДНК вырезать стерильным скальпелем из агарозного геля.

2. Поместить кусочек геля в шприц 26-го калибра и продавливать его через иглу.

3. Жидкость собрать в пробирку. Обрывки нитей агарозы осадить центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин.

Растворенная в буфере геля ДНК остается в супернатанте с выходом до 80%.

Занятие 19. Выделение ДНК из геля с помощью жидкого азота с последующей очисткой. Метод замораживания / оттаивания

Выделение ДНК из геля с помощью жидкого азота

1. Нужный фрагмент ДНК вырезать стерильным скальпелем из агарозного геля и поместить его в эппендорф.
2. Пробирку с вырезанным куском геля опустить в жидкий азот на 20 сек.
3. Центрифугировать 6 мин. при 14000 об./мин.
4. Забрать жидкость в новую пробирку, с азотом можно повторить.
5. Для очистки ДНК добавить половину 7,5М объема ацетата аммония, 2 объема 80% спирта.
6. Центрифугировать 12 мин. при 14000 об./мин.
7. Супернатант удалить, к осадку ДНК добавить 500 мкл 80% этилового спирта, центрифугировать 15 мин. при 14000 об./мин. Данный этап повторить дважды.
8. Подсушить пробирку на воздухе или 5-10 мин. при 37°C в суховоздушном термостате для удаления следов спирта.
9. Сухой осадок ДНК растворить в 50-200 мкл ТЕ-буфера или в деионизированной воде до полного исчезновения осадка.

Метод замораживания / оттаивания

1. Срезы геля агарозы толщиной 3-5 мм заморозить при – 20 °С.
2. Поместить между листками парафильма и сжимать пальцами в течение нескольких секунд. До 70% массы геля вытечет в виде жидкости, которую собирают в пробирку.

Не следует, однако, допускать охлаждения геля ниже указанной температуры. Под действием давления лед внутри

геля плавится, тем большее давление необходимо для его плавления.

3. К остатку геля добавить 50 мкл буфера и сжатие повторить.

4. Агарозу удалить центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин.

Выход ДНК составляет при этом около 70%. Показано, что ДНК с молекулярной массой до 50 млн. (как линейная, так и кольцевая) остается неповрежденной.

Занятие 20. Метод выделения ДНК с помощью центрифугирования. Определение чистоты и концентрации реампликона

1. Вырезать нужный фрагмент геля и поместить в ПЦР-пробирку, в дне которой нужно сделать небольшое отверстие.

2. Вставить ее в эппендорф и поместить в морозильную камеру при -20°C на 40 мин.

3. По истечении этого времени разморозить.

4. Повторно заморозить при -20°C два часа.

5. После кратковременного центрифугирования, 5 мин. (1000 g), ДНК-содержащий элюент остается во внешнем эппендорфе.

6. Препарат ДНК растворить в ТЕ-буфере. Растворы нуклеиновых кислот хранить при -20°C .

Данный метод достаточно простой в применении, не требует много времени и позволяет выделить одновременно много фрагментов ДНК любого размера.

Измеряется концентрация по стандартной методике по объему 1-1,5 мкл полученного реампликона в 1-3 повторностях на спектрофотометре NanoDrop 1000, в диапазоне длины волны 260 нм.

ТЕМА 9 ПОСТАНОВКА ПДРФ АНАЛИЗА И ПРОВЕДЕНИЕ CAPS-МАРКИРОВАНИЯ

Занятие 21. Эндонуклеазы рестрикции. Приготовление рестрикционной смеси

Рестриктазы подбирают по цели эксперимента. Их можно разделить на три группы. Ферменты типа I и III обладают модифицирующей (метилирующей) активностью и АТФ-зависимой рестриктирующей активностью (внесение разрывов), проявляемыми одним и тем же белком. При этом образуется сплошной спектр рестриктов, не детерминированных по размерам и содержанию информации. Разница в том, что ферменты типа I вносят случайные разрывы, в то время как ферменты типа III разрезают ДНК в специфических участках.

Рестриктазы II типа включают два отдельных фермента рестриктирующую эндонуклеазу и модифицирующую метилазу, которые действуют независимо, сайты узнавания совпадают с сайтами расщепления или находятся рядом с ними на определенном расстоянии, в результате чего получаются фрагменты ДНК воспроизводимого состава и длины.

По количеству сайтов рестрикции на ДНК эндонуклеазы весьма обобщенно делятся на редко щепящие (распознающие 6 пар оснований) и часто щепящие (распознающие 4 пары оснований). Так, средняя вероятность выявления 4-нуклеотидной последовательности выше по сравнению с 6-нуклеотидной, и составляет 1 сайт через каждые 256 оснований. Для 6-нуклеотидного сайта рестрикции эта цифра равняется 4096 нуклеотидам.

Рестриктазы, в присутствии ионов магния, расщепляют ДНК и вносят разрывы в обе цепи, в результате чего образуются продукты с тупыми или «липкими» концами, в последнем случае с 5'-выступающими или 3'-выступающими нуклеотидными последовательностями. Тупые концы образуют-

ся в случае, когда рестриктаза вносит разрывы в цепи ДНК строго друг напротив друга. «Липкие» концы способны соединяться с комплиментарными сайтами, что впоследствии используют для других молекулярных манипуляций с ДНК. Работа эндонуклеаз рестрикции приводит к образованию более коротких продуктов в эквимольных количествах, т.е. если продукты близки по размеру, при электрофоретическом разделении их полосы должны *a priori* иметь одинаковую интенсивность (таблица 8).

Таблица 8 – Характеристики некоторых эндонуклеаз рестрикции

Эндонуклеаза рестрикции	Сайт узнавания	$T^{\circ}\text{C}$ инкубации
<i>TaqI</i>	T↑CGA (AGC↓T)	65
<i>HinP1I</i>	G↑CGC (GCG↓C)	37
<i>HhaI</i>	GCG↑C (C↓GCG)	37
<i>PvuII</i>	CAG↑CTG (GTC↓GAC)	37
<i>HindIII</i>	A↑AGCTT (TTCGA↓A)	37
<i>XbaI</i>	T↑CTAGA (AGATC↓T)	37

Рестриктную обработку продуктов амплификации проводится в соответствующем буфере до рекомендованной концентрации 1× согласно инструкций, прилагаемых фирмой-производителем к каждой эндонуклеазе, а так же с добавлением BSA (бычьего сывороточного альбумина), как стабилизирующего фактора, при использовании эндонуклеазы *TaqI*. Время инкубации для рестриктаз составляет 2-4 часа при температуре 37°C. Смесь с *TaqI* инкубировать при 65°C.

Пропись для обработки рестриктазой *TaqI* одного образца ISSR-ПЦР-продукта представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Обработка рестриктазой *TaqI* одного образца ISSR-ПЦР-продукта

Компоненты	Концентрация на 1 пробу, мкл
Реампликон	7,0
MilliQ	4,6
Буфер	1,4
БСА	0,5
Эндонуклеаза	0,5
Общий объем – 14 мкл	

Инкубация – 2 часа при 65⁰С.

Пропись для обработки рестриктазой *HinP1I* одного образца ISSR-ПЦР-продукта представлена в таблице 10.

Таблица 10 – Обработка рестриктазой *HinP1I* одного образца ISSR-ПЦР-продукта

Компоненты	Концентрация на 1 пробу, мкл
Реампликон	7,0
MilliQ	3,5
Буфер	1,2
Эндонуклеаза	0,3
Общий объем – 12 мкл	

Инкубация – 4 часа при 37⁰С.

Продукты рестрикции оцениваются с помощью горизонтального электрофореза реампликонов в количестве 6 мкл с загрузочным красителем состава бромфеноловый синий + глицерин, в количестве 3 мкл, вносить в 2% агарозный гель, в 1× TBE буфере, при стартовом напряжении 90 В и основном напряжении фореза 50 В, в течение 60 мин.

Занятие 22. Использование CAPS-маркеров как дополнительный источник информации при типировании сортов

CAPS-маркеры представляют собой обособленную группу успешно применяемых в биологии растений, маркеров. Принцип действия CAPS-маркеров объединяет широко распространенный метод ПЦР с классическим методом ПДРФ (полиморфизм по длине рестрикционных фрагментов), но основан на амплификации небольшого фрагмента ДНК вместо использования всего генома.

В основе метода геномная ДНК амплифицируется с помощью пары высокоспецифичных праймеров, затем полученный фрагмент обрабатывается эндонуклеазами рестрикции; различия между геномами проявляются в виде разного количества и разных длин рестриктных фрагментов при электрофорезе в агарозном геле. Рестриктазы режут цепь в определенных сайтах распознавания. Они гидролизуют двойную цепь, оставляя фосфат на 5'-конце разрыва нити ДНК. Сайт распознавания в виде нуклеотидной последовательности должен точно совпадать по всем нуклеотидам, либо допускаются вариации отдельных нуклеотидов, при которых сайт все равно является субстратом для данного фермента. Особенностью этого этапа является частота различий в нуклеотидной последовательности между изучаемыми образцами ДНК, которая зависит от их биологических особенностей. В основном такие различия между образцами представляют собой однонуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism, SNP), а также инсерции или делеции (insertion-deletion, indel). Частота таких изменений в ДНК в значительной мере зависит от вида растений и популяции, а также от «гена интереса» и даже от положения ампликона в геноме (интрон, экзон или некодирующие районы). Очевидно, что чем выше частота изменений в изучаемых образцах, тем проще и удобнее разработать эффективный CAPS-маркер.

CAPS-маркеры, основанные на фрагментах ДНК, тесно сцепленных с изучаемыми генами, особенно полезны для маркер-ориентированной селекции (marker-assisted selection, MAS) и широко используются в отборе на устойчивость культурных растений к фитопатогенам. Тем не менее CAPS-маркеры можно успешно разрабатывать на любых фрагментах генома. Данную методику часто применяют при создании генетических карт, а также для точной локализации изучаемых генов. С ее использованием были впервые созданы молекулярно-генетические карты некоторых видов растений и картирован целый ряд генов и локусов количественных признаков (QTL), контролирующих тип развития растений, устойчивость к фитопатогенам, качество зерна (у некоторых видов злаков) и форму плодов (у томата). Важное применение CAPS-маркеры находят в филогенетических исследованиях, при изучении генетического полиморфизма, особенно у близких видов.

Преимущества CAPS-маркеров – это кодоминантный тип наследования, при котором не только гомо-, но и гетерозиготные генотипы четко отличаются друг от друга, простота идентификации получаемых результатов, так как продукты гидролиза четко представлены всего одним или несколькими фрагментами в геле и отсутствие необходимости использования дорогостоящего и сложного оборудования.

На первом этапе исследования берутся мономорфные ISSR-ПЦР-фрагменты, т.е. идентичные и постоянные для всего набора сортов.

На втором этапе данные фрагменты элюируются из агарозного геля.

На третьем этапе элюированные фрагменты подвергают обогащению через повторную амплификацию.

На четвертом этапе проводится расщепление их эндонуклеазами рестрикции. Наглядно, образец амплификации, у которого присутствует сайт рестрикции, будет представлен двумя фрагментами.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бакай, А.В. Генетика / А. В. Бакай, И.И. Кочиш, Г.Г. Скрипниченко. – М.: КолосС, 2007. – 448 с.: ил.
2. Бокуть, С.Б. Молекулярная биология / С.Б. Бокуть, Н.В. Герасимович, А.А. Милютин – Мн.: Выш. шк., 2005. – 463 с.
3. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак – пер. с англ. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
4. Иванова, В.И. Геномика / В.И. Иванова. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2007. – 638 с.: ил.
5. Инге-Вечтомов, С.Г. Генетика с основами селекции / С.Г. Инге-Вечтомов. – СПб.: Изд-во Н-Л, 2010. – 720 с.: ил.
6. Основы генетики: учебник для студентов учреждений высш. проф. Образования / А.Ю. Асанов [и др.]. – М.: Издательский центр «Академия, 2012. – 288 с.: ил.
7. Попов, В.В. Геномика с молекулярно-генетическими основами: монография / В.В. Попов. – М.: Либроком КД, 2009. – 304 с.
8. ПЦР «в реальном времени» / Д.В. Ребриков [и др.]. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.: ил.
9. Рыбчин, В.Н. Основы генетической инженерии / В.Н. Рыбчин; 2-е изд., перераб. и доп. – СПб.: Изд-во СПбГТУ, 2002. – 522 с.
10. Сазанов, А.А. Геномика / А.А. Сазанов. – СПб.: ЛГУ им. А.С. Пушкина, 2011. – 264 с.
11. Уильямс, С.К. Основы генетики / С.К. Уильямс, С.К. Клаг. – М.: Техносфера, 2007 – 896 с.
12. Щелкунов, С.Н. Генетическая инженерия: учеб.-справ. Пособие / С.Н. Щелкунов. – 3-е изд., испр. И доп. – Новосибирск: Сиб. Унив. Изд-во, 2008. – 514 с.: ил.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
ТЕМА 1. ВВЕДЕНИЕ	4
Занятие 1. Занятие 1. Структура и организация генома	4
ТЕМА 2. УСТРОЙСТВО ПЦР-ЛАБОРАТОРИИ	36
Занятие 2. Организация работы ПЦР-диагностической лаборатории.	
Перечень необходимого оборудования	36
ТЕМА 3. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЯДЕРНОЙ ДНК	44
Занятие 3. Приготовление концентрированных растворов для выделения ядерной ДНК	44
Занятие 4. Приготовление рабочих растворов для выделения ядерной ДНК	46
Занятие 5. Выделение ядерной ДНК из растений с высоким содержанием полифенолов и полисахаридов протоколам ЦТАБ-RVP-меркаптоэтанол	47
Занятие 6. Выделения ядерной ДНК из ткани животных перхлоратным методом	48
Занятие 7. Выделение ядерной ДНК из эпителиальной ткани перхлоратным методом	49
Занятие 8. Выделение ядерной ДНК из бактерий	50
Занятие 9. Выделение ядерной ДНК из грибов	52
ТЕМА 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНК И СТЕПЕНИ ЕЕ ОЧИСТКИ	55
Занятие 10. Спектрофотометрическое определение концентрации и очистки ДНК. Электрофоретическое определение концентрации ДНК. Разведение и хранение образцов ДНК	55
ТЕМА 5. ПОСТАНОВКА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ	58
Занятие 11. Молекулярные основы и постановка обычной ПЦР. Компоненты ПЦР-реакции, их концентрации и разведения. Этапы ПЦР. Подбор программы амплификации, работа с ДНК-термоциклером	58
Занятие 12. RAPD-ПЦР-анализ с произвольным праймером	65
Занятие 13. ISSR-ПЦР-анализ с использованием пяти праймеров (UBC 808,818, 824, 845, 867)	66
ТЕМА 6. ДЕТЕКЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ПЦР	70
Занятие 14. Молекулярные основы электрофореза нуклеиновых кислот. Правила техники безопасности	70
Занятие 15. Визуализация продуктов ПЦР методом горизонтального электрофореза	71

Занятие 16. Метод вертикального электрофореза. Особенности электрофореза в полиакриламидном геле. Приготовление буфера для электрофора. Нанесение ампликонов в лунки	73
ТЕМА 7. ВИЗУАЛИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИС-ЛОТ В УФ-СВЕТЕ	75
Занятие 17. Применение трансиллюминатора. Безопасность работы. Окончательная обработка электрофоретических профилей с помощью компьютерных про-грамм. Принципы чтения ПЦР-профилей	75
ТЕМА 8. ЭЛЮЦИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ИЗ ГЕЛЕЙ АГАРОЗЫ	77
Занятие 18. Применение метода «ловчей лунки». Выделение ДНК после гомогенизации геля через иглу	77
Занятие 19. Выделение ДНК из геля с помощью жидкого азота с последующей очисткой. Метод замораживания / оттаивания	79
Занятие 20. Метод выделения ДНК с помощью центрифугирования. Определение чистоты и концентрации реампликона	80
ТЕМА 9 ПОСТАНОВКА ПДРФ АНАЛИЗА И ПРОВЕДЕНИЕ CAPS-МАРКИРОВАНИЯ	81
Занятие 21. Эндонуклеазы рестрикции. Приготовление рестрикционной смеси	81
Занятие 22. Использование CAPS-маркеров как дополнительный источник информации при типировании сортов	84
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	86

Учебное издание

Глинская Наталья Анатольевна
Водчиц Наталья Васильевна
Волкова Елена Михайловна
Каспирович Дмитрий Анатольевич

Методы работы с ДНК

Методическое пособие

Ответственный за выпуск *П.Б. Пигаль*

Издание печатается в авторской редакции